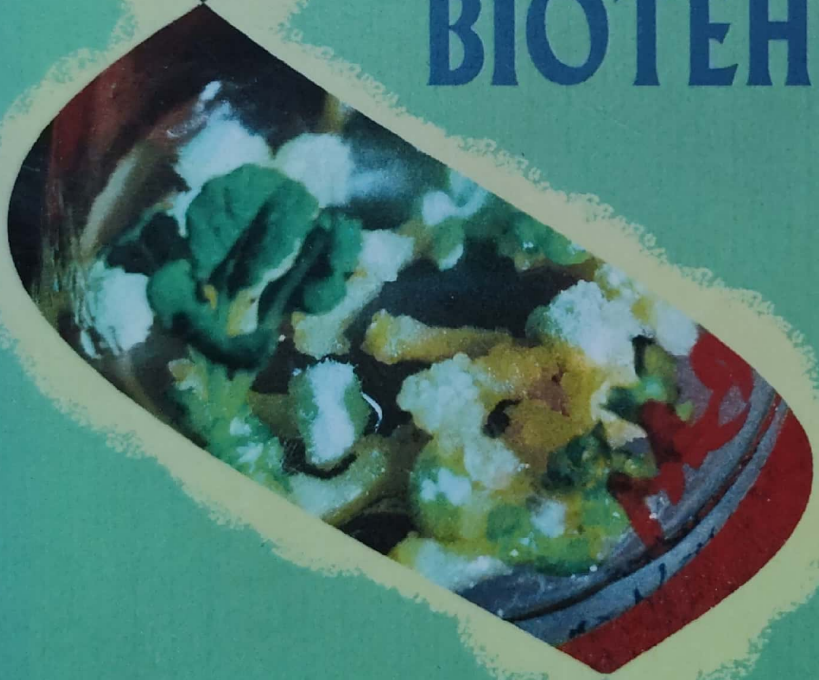
Gogu GHIORGHIȚĂ
Daniela PETRESCU NICUȚĂ

BIOTEHNOLOGIILE AZI



JUNIMEA

Scanned with OKEN Scanner

Gogu GHIORGHIȚĂ
Daniela PETRESCU NICUȚĂ

BIOTEHNOLOGIILE AZI

Prietenului nostru – profesor dr. **Constantin Măzăreanu,**
cu speranța că bunul Dumnezeu ni-l va reda
așa cum a fost până nu demult

Scanned with OKEN Scanner

Coperta: *Dragoş Ganaite*

Tehnoredactare: *Carmen Olaru, Elena Şova*

Lucrarea a fost realizată cu suport financiar din proiectele nr. 38/1997 şi nr. 502/2005, perfectate cu CNFIS şi CNCSIS din cadrul Ministerului Educaţiei şi Cercetării

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
GHIORGHIŢĂ, GOGU
Biotehnologiile azi / Gogu Ghiorghiţă, Daniela Petrescu Nicuţă – Iaşi: Junimea, 2005
ISBN 973-37-1099-7

I. Petrescu Nicuţă, Daniela

57:62

Editura JUNIMEA, Iaşi – ROMÂNIA,
Bd. Carol I, nr.3-5, cod 700506,
tel./fax: 0232-410427
e-mail: junimeais@yahoo.com

Scanned with OKEN Scanner

Gogu GHIORGHIȚĂ
Daniela PETRESCU NICUȚĂ

BIOTEHNOLOGIILE AZI

EDITURA JUNIMEA
IAȘI - 2005

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

1. BIOTEHNOLOGIILE – DEFINIȚIE, SFERĂ DE PREOCUPĂRI 11
2. BIOTEHNOLOGII UTILIZATE ÎN DOMENIUL SĂNĂTĂȚII 16
   2.1. Biotehnologii pentru producerea vitaminelor 16
   2.2. Biotehnologii pentru producerea antibioticelor 22
      2.2.1. Producerea penicilinelor 25
      2.2.2. Producerea cefalosporinelor 28
      2.2.3. Producerea antibioticelor aminoglicozidice 29
      2.2.4. Producerea de antibiotice macrociclice 32
      2.2.5. Producerea de antibiotice cu nucleu chinonic 33
      2.2.6. Producerea de antibiotice cu nucleu aromatic 35
   2.3. Culturile de țesuturi și celule animale și implicațiile lor biotehnologice 36
   2.4. Producerea vaccinurilor 38
   2.5. Hibridomii și producerea de anticorpi monoclonali 44
   2.6. Ingineria genetică și implicațiile ei în medicină. Tehnologia ADN-recombinant 46
      2.6.1. Enzimele de restricție și de modificare 48
      2.6.2. Vectori folosiți în transferul genelor 49
      2.6.3. Utilizarea tehnologiei ADN-recombinant în producerea unor substanțe de interes medical 51
   2.7. Utilizarea culturilor de celule vegetale în suspensie pentru producerea substanțelor cu uz farmaceutic 53
   2.8. Utilizarea transgenezei în terapia genică și a cancerului la om 62
3. BIOTEHNOLOGII PENTRU PRODUCEREA DE PROTEINE, ENZIME ȘI AMINOACIZI 64
   3.1. Producerea de proteine prin metode neconvenționale 64
      3.1.1. Materii prime folosite pentru producerea de proteine monocelulare 65
      3.1.2. Microorganisme folosite în producerea de proteine monocelulare 69
      3.1.3. Condiții ce trebuie îndeplinite de proteinele monocelulare pentru a fi folosite 72
      3.1.4. Cultura de cianobacterii și microalge 74
   3.2. Biotehnologii de producere a enzimelor 80
      3.2.1. Producerea de enzime prin cultivarea microorganismelor 82
      3.2.2. Unele enzime microbiene și utilizarea lor 84
      3.2.3. Metode utilizate pentru stabilizarea preparatelor enzimatice 91

Scanned with OKEN Scanner

3.2.4. Imobilizarea enzimelor 92
3.2.4.1. Metode de imobilizare a preparatelor enzimatice 93
3.2.4.2. Utilizarea enzimelor imobilizate 97
3.3. Producerea aminoacizilor 100
4. BIOTEHNOLOGII UTILIZATE ÎN AGRICULTURĂ 109
4.1. Culturile de țesuturi și celule *in vitro*, instrument de manipulare a genomului la plante 111
4.1.1. Tehnologia de cultivare *in vitro* a țesuturilor și celulelor vegetale 112
4.1.2. Căi de morfogeneză în cultura *in vitro* la plante 124
4.1.2.1. Generarea de calus în culturile *in vitro* (calusogeneza, calogeneza) 125
4.1.2.2. Organogeneza *in vitro* 130
4.1.3. Utilizarea culturilor *in vitro* pentru micropropagarea plantelor 149
4.1.4. Obținerea de plante libere de virusuri 155
4.1.5. Obținerea de protoplaști și de hibrizi somatici la plante 158
4.1.5.1. Izolarea protoplaștilor 158
4.1.5.2. Cultura protoplaștilor și regenerarea plantelor 161
4.1.5.3. Obținerea de hibrizi somatici la plante 165
4.1.5.4. Importanța tehnologiei de fuziune a protoplaștilor la plante 171
4.1.6. Haploidia experimentală la plante și implicațiile ei 173
4.1.6.1. Androgeneza experimentală 176
4.1.6.2. Ginogeneza experimentală 190
4.1.6.3. Importanța teoretică și practică a haploidiei experimentale 195
4.1.7. Variabilitatea somaclonală și importanța ei practică 196
4.1.7.1. Cauzele variabilității somaclonale 196
4.1.7.3. Tehnici practicate în obținerea variațiilor somaclonale în culturile *in vitro* la plante 198
4.1.7.4. Suportul genetic al variațiilor somaclonale 200
4.1.7.5. Tipuri de mutații somaclonale și identificarea lor 210
4.1.7.6. Inducerea variabilității genetice *in vitro* prin intervenția cu agenți mutageni 211
4.1.7.7. Specularea în practică a variabilității somaclonale 217
4.2. Transferul de gene la plante și animale 220
4.2.1. Vectori folosiți în transgeneză la plante și animale 221

Scanned with OKEN Scanner

4.2.2. Unele realizări şi perspective ale transgenezei la plante 223
4.2.3. Unele realizări şi perspective ale transgenezei la animale 229
4.2.4. Riscuri şi "legende" privind folosirea OMG 230
4.3. Clonarea la animale şi perspectivele ei 237
4.3.1. Clonarea embrionară 239
4.3.2. Clonarea somatică 241
4.3.3. Riscurile clonării somatice 245
4.3.4. Unele aplicaţii ale clonării somatice 248
4.3.5. Implicaţii bioetice ale clonării somatice 252
5. BIOTEHNOLOGII UTILIZATE ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ 253
5.1. Biotehnologii pentru prepararea de produse din lapte 254
5.1.1. Producerea iaurtului 258
5.1.2. Prepararea brânzeturilor 258
5.2. Obţinerea de produse de fermentaţie din soia 262
5.3. Producerea de legume conservate prin fermentaţie lactică 264
5.4. Producerea prin fermentaţie a acizilor organici 265
6. BIOTEHNOLOGII PENTRU PRODUCEREA DE ENERGIE 270
6.1. Biomasa ca sursă de energie 271
6.2. Producerea de combustibili cu ajutorul plantelor 275
6.3. Producerea de biogaz 278
7. BIOTEHNOLOGII PENTRU PROTECŢIA MEDIULUI 281
7.1. Poluarea mediului – componentă a civilizaţiei umane 281
7.1.1. Poluarea atmosferei 282
7.1.2. Poluarea solului 285
7.1.3. Poluarea apelor continentale şi marine 288
7.2. Rezolvarea contradicţiei: protecţia plantelor – protecţia mediului 296
7.2.1. Strategii pentru controlul bolilor la plante 296
7.2.2. Strategii pentru combaterea buruienilor 300
7.2.3. Strategii pentru combaterea dăunătorilor 302
REFERINŢE BIBLIOGRAFICE 306

Scanned with OKEN Scanner

CONTENT

1. BIOTECHNOLOGIES – DEFINITION, AREA OF INTEREST 11
2. BIOTECHNOLOGIES USED IN HEALTHCARE 16
   2.1. Biotechnologies for vitamin production 16
   2.2. Biotechnologies for antibiotics production 22
      2.2.1. Penicillins yield 25
      2.2.2. Cephalosporines production 28
      2.2.3. Aminoglycosidic antibiotics production 29
      2.2.4. Macrocyclic antibiotics yield 32
      2.2.5. Production of quinonic nucleus antibiotics 33
      2.2.6. Production of aromatic nucleus antibiotics 35
   2.3. Animal tissue and cell cultures and their biotechnological implications 36
   2.4. Vaccines production 38
   2.5. Hybridomes and the yield of monoclonal antibodies 44
   2.6. Genetic engineering and its implications in medicine. Recombinant DNA technology 46
      2.6.1. Restriction and modification enzymes 48
      2.6.2. Vectors used in gene transfer 49
      2.6.3. Recombinant DNA technology and the production of medical interest substances 51
   2.7. Plant cell suspension cultures used to obtain substances of pharmaceutical interest 53
   2.8. Transgenesis utilized in gene and human cancer therapy 62
3. BIOTECHNOLOGIES FOR THE YIELD OF PROTEINS, ENZYMES AND AMINOACIDS 64
   3.1. Protein production by means of unconventional methods 64
      3.1.1. Raw material to produce single-cell proteins 65
      3.1.2. Microorganisms single-cell proteins yield 69
      3.1.3. Conditions that must be carried out by single-cell proteins in order to be used 72
      3.1.4. Cyanobacteria and microalgae cultures 74
   3.2. Biotechnologies for the yield of enzymes 80
      3.2.1. Producing enzymes within cultures of microorganisms 82
      3.2.2. Some microbial enzymes and their utility 84
      3.2.3. Methods to stabilize enzymatic preparations 91
      3.2.4. Enzyme immobilization 92
         3.2.4.1. Methods for enzyme immobilization enzymatic preparations 93
         3.2.4.2. The use of immobilized enzymes 97

Scanned with OKEN Scanner

3.3. The production of aminoacids 100
4. BIOTECHNOLOGIES USED IN AGRICULTURE 109
4.1. *In vitro* tissue and cell cultures, a way to manipulate plant genome 111
4.1.1. The technology of in vitro vegetal tissue and cell cultures 112
4.1.2. *In vitro* morphogenetic paths in plants 124
4.1.2.1. Callus generation in *in vitro* cultures (callogenesis) 125
4.1.2.2. *In vitro* organogenesis 130
4.1.3. *In vitro* cultures used in plant micropropagation 149
4.1.4. Obtaining virus-free plants 155
4.1.5. Producing vegetal protoplasts and somatic hybrids 158
4.1.5.1. Protoplasts' isolation 158
4.1.5.2. Protoplast culture and plant regeneration 161
4.1.5.3. Producing plant somatic hybrids 165
4.1.5.4. The importance of protoplast fusion in plants 171
4.1.6. Experimental haploidy in plants and its implications 173
4.1.6.1. Experimental androgenesis 176
4.1.6.2. Experimental gynogenesis 190
4.1.6.3. The theoretical and practical importance of the experimental haploidy 195
4.1.7. The use of somaclonal variability to provide new plant genotypes 196
4.1.7.1. The causes of somaclonal variability 196
4.1.7.2. Methods to obtain somaclonal variability in *in vitro* plant cultures 198
4.1.7.3. Genetic support of somaclonal variability 200
4.1.7.4. Types of somaclonal mutations and their identification 210
4.1.7.5. *In vitro* genetic variability induced by mutagene agents 211
4.1.7.6. Practical approach of somaclonal variability 217
4.2. Gene transfer in plants and animals 220
4.2.1. Transgenetic vectors in plants and animals 221
4.2.2. Some accomplishments and perspectives of plant transgenesis 223
4.2.3. Some accomplishments and perspectives of animal transgenesis 229
4.2.4. Risks and "myths" concerning the use of OMG 230
4.3. Animal cloning and its perspectives 237

Scanned with OKEN Scanner

4.3.1. Embryonic cloning 239
4.3.2. Somatic cloning 241
4.3.3. The risks of somatic cloning 245
4.3.4. Some applications of somatic cloning 248
4.3.5. Bioethical implications of somatic cloning 252
5. BIOTECHNOLOGIES USED IN FOOD INDUSTRY 253
5.1.Biotechnologies for dairy production 254
5.1.1. Yoghurt production 258
5.1.2. Cheese production 258
5.2. Obtaining ferments out of soybeans 262
5.3. The production of tinned vegetables by means of lactic ferments 264
5.4. Organic acids as fermentation products 265
6. BIOTECHNOLOGIES FOR ENERGY GENERATION 270
6.1. Biomass – a source of energy 271
6.2. Fuels' generation by means of plants 275
6.3. Biogas production 278
7. BIOTECHNOLOGIES FOR ENVIRONMENTAL PROTECTION 281
7.1. Environmental pollution – a part of human civilization 281
7.1.1. Air pollution 282
7.1.2. Soil pollution 285
7.1.3. Continental and sea water pollution 288
7.2. Solving a contradiction: plant protection – environmental protection 296
7.2.1. Strategies for plant diseases control 296
7.2.2. Strategies for weed control 300
7.2.3. Strategies for pest control 302
REFERENCES 306

Scanned with OKEN Scanner

1. BIOTEHNOLOGIILE – DEFINIȚIE, SFERĂ DE PREOCUPĂRI

Biotehnologiile reprezintă un ansamblu de metode, tehnici şi procedee prin care cu ajutorul sistemelor biologice sau a unor componente ale acestora, se obțin produse alimentare şi industriale, se asigură unele servicii (HARLANDER, 1987). Potrivit definiției propuse de Federația Europeană de Biotehnologie, biotehnologiile reprezintă aplicarea integrată a tehnicilor din domeniile biochimiei, microbiologiei, geneticii şi ingineriei chimice pentru obținerea de substanțe şi compuşi utili omului. Biotehnologiile utilizează bacterile, levurile, celulele vegetale şi animale în obținerea unor substanțe şi produse specifice (SASSON, 1988). Biotehnologia este un domeniu prin excelență interdisciplinar, în care biologia, în general, se interferează cu biochimia şi biofizica, cu ingineria şi informatica, un domeniu care valorifică sub diverse forme cele mai noi cunoştințe din biologia fundamentală şi aplicată.

Definiția dată biotehnologiei nu este suficient de restrictivă. De aceea se întâlnesc lucrări care-i lărgesc sfera la tot ceea ce implică folosirea organismelor vii în producerea de substanțe şi servicii necesare omului – de la tehnologiile moderne utilizate în creşterea producției vegetale şi animale, până la ingineria genetică şi aportul ei în obținerea de organisme cu caractere mai valoroase, de produse de natură biologică, de corectarea unor deficiențe genetice ale organismelor etc. O astfel de abordare nu pare a fi întrutotul exagerată, având în vedere faptul că este uneori dificil de apreciat până unde se poate vorbi de agricultură şi de unde începe biotehnologia. Dealtfel, într-o lucrare anterioară (GHIORGHIȚĂ şi ONISEI, 1990), consideram că în funcție de nivelul de cunoaştere implicat, de gradul lor de dificultate şi de ansamblul mijloacelor tehnice necesare pentru valorificarea lor, biotehnologiile s-ar putea clasifica astfel:

a) tehnologii convenționale utilizate pentru creşterea productivității în agricultură, producerea de biomasă, proteine, substanțe utile şi energie;
b) biotehnologii care utilizează microorganismele, culturile de țesuturi animale şi vegetale, hibridarea somatică în producerea de genotipuri noi, de substanțe şi servicii;

Scanned with OKEN Scanner

c) biotehnologii care utilizează tehnologia ADN-recombinant, transgeneza şi clonarea la organismele vii pentru obţinerea de organisme noi, substanţe şi servicii necesare omului.

În lucrarea de faţă ne vom referi la biotehnologiile incluse în categoriile b şi c.

Deşi sunt opinii că epoca biotehnologiilor a început pe la jumătatea secolului al XIX-lea, odată cu descoperirea de către VON LIEBIG a nutriţiei minerale a plantelor în soluţii nutritive (TORREY, 1985), acest domeniu a devenit unul extrem de fecund şi de mare perspectivă începând cu a doua jumătate a secolului trecut, ca o consecinţă a marilor progrese înregistrate de biologia celulară, moleculară şi de genetică. În mod empiric însă unele biotehnologii, cum ar fi de exemplu fermentaţiile cu ajutorul microorganismelor pentru prepararea berei, vinului, pâinii, conversia alcoolului etilic în oţet etc, erau cunoscute de babilonieni şi sumerieni cu câteva milenii înainte de Christos.

Bazele biotehnologiei, să-i spunem ştiinţifice, au fost puse odată cu descoperirea microorganismelor cu ajutorul microscopului inventat de VAN LEUWENHOEK în secolul al XVII-lea, care a permis observaţia că în apă, în decoctul de fân, în mustul de bere, în salivă etc, există mici organisme de formă diferită pe care le-a denumit „animalicule", (MILICĂ, 1999). O importanţă covârşitoare în fundamentarea ştiinţifică a acestui domeniu au avut cercetările din secolul al XIX-lea ale marelui savant francez L. PASTEUR, care au pus bazele microbiologiei, imunologiei şi biochimiei. Lucrările lui PASTEUR au produs „prima revoluţie biotehnologică", care a asigurat controlul diverselor procese de fermentaţie (etilică, butirică, lactică, acetobutilică), producerea industrială a vaccinurilor şi antibioticelor. Descoperirea structurii ADN, a enzimelor implicate în sinteza acestei macromolecule, a codului genetic, a mecanismului sintezei proteinelor şi reglării genetice, a sintezei artificiale a genelor, descoperirea transcriptazei inverse etc, au permis trecerea după 1970 la „a doua revoluţie biotehnologică", (SASSON, 1988), la ingineria genetică şi operaţiile de transgeneză la organismele vii. Imediat după 1970 s-au creat şi primele societăţi care îşi propuneau să valorifice descoperirile din domeniul ingineriei genetice, dintre care cele mai spectaculoase rezultate aveau să obţină în scurt timp unele societăţi americane (CETUS, GENENTECH, GENEX, BIOGEN).

Scanned with OKEN Scanner

Biotehnologiile moderne utilizează tehnicile de recombinare genetică *in vitro*, imobilizarea celulelor şi enzimelor pe diverse suporturi, culturile de celule vegetale, animale şi de microorganisme, hibridările somatice, transgeneza etc, în producerea de principii active, vaccinuri, hormoni, proteine, interferoni, anticorpi monoclonali.

Multe dintre biotehnologiile clasice şi moderne se bazează pe specularea activităţii microorganismelor şi manipularea lor genetică. Unele dintre microorganismele utilizate, ca drojdiile şi mucegaiurile sunt de tip *eucariot*, altele, ca bacteriile, sunt de tip *procariot*.

Drojdiile reprezintă un grup format din peste 500 de specii, folosite empiric încă din antichitate la prepararea berei, vinului şi pâinii. Unele drojdii ca *Saccharomyces cerevisiae, S. lipolytica, Candida arborea, C. utilis*, sunt folosite şi la producerea de proteine monocelulare, prin cultivarea lor pe scară industrială şi pe diverse substraturi ca sursă de carbon, cum ar fi: parafinele, zerul rezultat din industria laptelui, grăsimile reziduale din abatoare, unele subproduse de la fabricile de hârtie etc.

Mucegaiurile fac parte din grupul de fungi filamentoase *Mycota*, dintre care unele sunt folosite la fabricarea brânzeturilor (*Penicillium roquefortii, P. camembertii*), altele la prepararea băuturilor alcoolice (*Aspergillus oryzae)*, a antibioticelor (*Penicillium chrysogenum*), a unor enzime (*Aspergillus sp*) etc.

Bacteriile reprezintă un grup mare de microorganisme, cu utilizări multiple în procesele biotehnologice. Astfel, unele sunt folosite la prepararea iaurtului (*Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophillus*), altele la prepararea oţetului (*Gluconobacter suboxidans*), a proteinelor monocelulare din metan sau metanol (*Methylophilus methylotrophus*), a antibioticelor (*Streptomyces sp*), a aminoacizilor (*Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum*), a vitaminei B_{12} (*Pseudomonas denitrificans*) etc.

Despre utilizarea microorganismelor în procesele de fermentaţie sau în producerea diverselor substanţe necesare omului vom discuta pe larg în capitolele ce urmează. Considerăm oportun să lămurim aici termenii de *metaboliţi primari* şi *secundari* cu care ne vom întâlni pe parcursul lucrării. Metaboliţii primari sunt compuşi cu moleculă mică sintetizaţi în celule şi sunt reprezentaţi în organism de aminoacizi, acizi organici, baze azotate, glucide şi vitamine, care asigură creşterea şi

Scanned with OKEN Scanner

înmulțirea lor. Metaboliții secundari sunt sintetizați de asemenea în celule, dar nu sunt implicați în creșterea și înmulțirea lor, ci în protecția organismelor, în competiția unor organisme cu altele etc, iar din această categorie fac parte alcaloizii, antibioticele, unele toxine etc. Metaboliții secundari sunt însă substanțe foarte utile în medicina umană și veterinară.

În cazul culturilor de microorganisme se disting două faze și anume:

a) *tropofaza,* în care are loc creșterea lor exponențială și acumularea de biomasă celulară, fază în care se formează în cantitate mare metaboliții primari;
b) *idiofaza*, în care creșterea și diviziunea celulelor încetează, din cauza epuizării nutrienților și acumulării substanțelor toxice, fază în care metabolismul rămâne activ și în care se sintetizează metaboliții secundari sau *idioliții.*

Odată cu dezvoltarea biotehnologiilor s-a dezvoltat și bioingineria, perfecționându-se continuu mijlocele tehnice pentru valorificarea diverselor biotehnologii și anume: bioreactoarele, sistemele de măsură și control, traductorii, tehnicile de purificare și concentrare a substanțelor etc. Asistăm totodată la extinderea biotehnologiilor în agricultură, industria alimentară, chimică, farmaceutică, extractivă, în combaterea poluării și ocrotirea mediului, în obținerea de energie pe căi neconvenționale. Astfel, în agricultură biotehnologiile pot asigura transferul de gene și obținerea de noi soiuri de plante și rase de animale, clonarea genotipurilor valoroase, obținerea de bioinsecticide; în industria alimentară se produc proteine, aminoacizi, vitamine prin cultivarea microalgelor, levurilor și bacteriilor, prin folosirea celulelor și enzimelor imobilizate; în industria chimică se pot obține cu ajutorul biotehnologiilor antibiotice, hormoni, vaccinuri, interferoni; în biometalurgie se folosesc unele microorganisme pentru extracția anumitor metale utile; în combaterea poluării și ocrotirea mediului ambiant, biotehnologiile permit reciclarea unor deșeuri, tratarea apelor uzate industrial; în domeniul energetic, biotehnologiile contribuie la obținerea din biomasă a metanolului, etanolului, biogazului, hidrogenului etc, (SASSON, 1988).

În condițiile creșterii demografice evidente din ultimele decenii, omenirea va fi confruntată cu tot mai multe probleme în domeniul

Scanned with OKEN Scanner

alimentației, sănătății, nevoilor de energie, a protecției mediului ambiant. Fără îndoială că o contribuție importantă, dacă nu esențială, în rezolvarea unora din aceste probleme va avea dezvoltarea şi diversificarea biotehnologiilor. Progresele înregistrate în ultimii ani în domeniul biologiei celulare şi moleculare, a ingineriei genetice, secvențierea genomului la diverse organisme etc, vor conduce şi la identificarea de noi soluții biotehnologice în obținerea de soiuri de plante şi rase de animale mai productive, în diagnosticarea şi tratamentul unor boli (inclusiv ereditare), în obținerea de produse noi în industria alimentară, chimică, farmaceutică, în probleme de bioenergie, în bioprotecția mediului etc.

Importanța unora din descoperirile majore în domeniul biologiei ultimelor 4 decenii nu a scăpat întreprinzătorilor, astfel încât numărul firmelor care valorifică aceste descoperiri şi care practică diverse biotehnologii pentru obținerea de produse şi servicii solicitate pe piață a crescut enorm în această perioadă, mai cu seamă în țările puternic dezvoltate cum sunt: SUA, Canada, Japonia, țările Uniunii Europene etc. Încasările lor anuale se cifrează la zeci de miliarde de dolari. În Europa, un rol important în coordonarea programelor de biotehnologie în cooperarea firmelor specializate din 20 de țări europene (majoritatea țări din UE) revine Societății Internaționale EUREKA, înființată în 1992. Această societate numără peste 400 de firme partenere şi participă la rezolvarea a peste 100 de proiecte de cercetare cu profil biotehnologic.

Încă din 1981, prin studiul *Delphy* (elaborat de o serie de specialişti în biotehnologie) se prefigurau anumite obiective ce vor fi atinse în deceniile următoare până la sfârşitul primului deceniu al acestui secol. Marile provocări ale biologiei, bioingineriei şi biotehnolgiei în acest prim deceniu al secolului XXI par a fi:

- transferul genelor fixatoare de azot la unele plante cultivate, în special la cereale;
- o mai bună cunoaştere a mecanismelor imunității, a procesului de îmbătrânire la om şi a soluțiilor pentru întârzierea acestuia;
- izolarea unor gene ce determină boli ereditare, terapia genică a acestor boli, precum şi a unor maladii umane grave, cum sunt cancerul şi SIDA etc, (RAICU, 1987; MILICĂ, 1999).

Scanned with OKEN Scanner

În capitolele ce urmează vom prezenta unele realizări şi perspectivele biotehnologiei în câteva domenii de mare interes economic şi social.

2. BIOTEHNOLOGII UTILIZATE ÎN DOMENIUL SĂNĂTĂŢII

2.1. Biotehnologii pentru producerea vitaminelor

Vitaminele sunt substanţe cu rol esenţial în viaţa animalelor şi omului, fiind implicate în creşterea organismului, menţinerea funcţiilor şi troficităţii ţesuturilor şi organelor, a stării de sănătate. Alături de hormoni sunt biocatalizatori. Carenţa unor vitamine în organismul uman este cunoscută sub numele de hipovitaminoză sau avitaminoză. Necesarul în vitamine a organismului variază în funcţie de vârstă, de starea de sănătate, de anumite tratamente medicamentoase, de efortul fizic efectuat etc. Vitaminele sunt indicate la om în perioada de creştere, în momentul sarcinii şi perioadei de lactaţie, însoţesc tratamentele cu radiaţii, sulfamide şi antibiotice (care afectează flora microbiană intestinală) pentru evitarea hipovitaminozelor, sau în combaterea stărilor de hipovitaminoză şi avitaminoză. Unele vitamine sunt hidrosolubile, altele sunt liposolubile.

Numeroase microorganisme au capacitatea ca, pe baza componenţilor nutritivi din mediul de cultură minimal, să sintetizeze vitaminele şi factorii necesari creşterii şi înmulţirii lor. Uneori vitaminele şi provitaminele sunt produse de anumite microorganisme în cantităţi mult mai mari decât nevoile lor şi atunci aceste substanţe sunt eliminate în mediul de cultură, de unde pot fi extrase şi purificate. Aşa, de exemplu, bacteria *Pseudomonas denitrificans* produce de peste 50 de mii de ori mai multă vitamină B_{12} decât necesarul propriu.

Vitaminele sunt dealtfel substanţe indispensabile şi pentru realizarea anumitor procese metabolice şi reacţii enzimatice în organismele animale şi umane, pe care acestea fie le pot sintetiza, fie le iau din hrană. Deşi, în celulele diverselor microorganisme s-au pus în evidenţă vitaminele B_1 (tiamina), B_2 (riboflavina), B_5 (acidul pantotenic), B_{12} (ciancobalamina), C (acidul ascorbic), F (acidul folic), H (biotina), K

Scanned with OKEN Scanner

(acidul para-aminobenzoic), PP (nicotinamida) şi provitaminele A, C şi D, puţine dintre acestea înregistrează un randament bun pentru producerea industrială. În această categorie intră în special vitaminele B_2 şi B_{12}, carotenul (precursor de vitamină A), L – sorboza şi acidul 5-cetogluconic (precursor de vitamină C) etc.

Vitamina B_1, tiamina sau *aneurina* are în structura ei un ciclu pirimidinic legat de un ciclu tiazolic printr-o legătură metilenică (fig. 2.1).

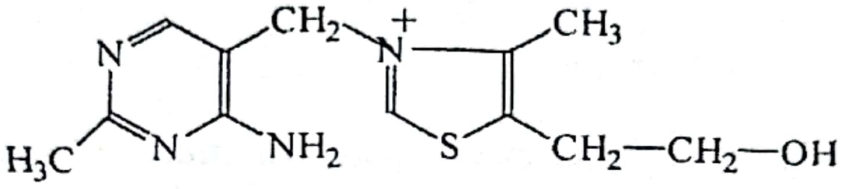


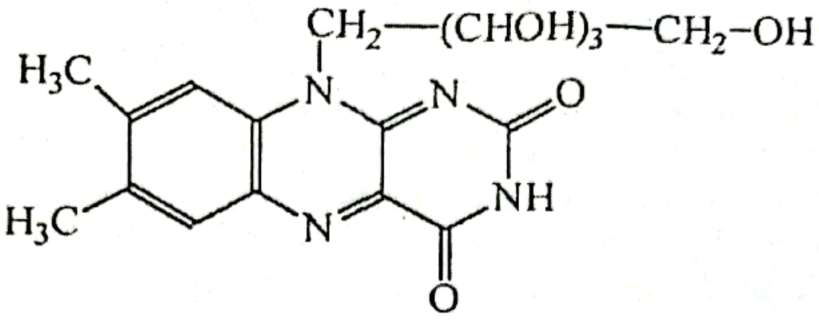
Fig. 2.1. Vitamina B_1

Purificată, se prezintă sub formă cristale mici incolore, sau ca o pulbere albă cu gust amar şi miros specific, solubilă în apă. Se oxidează uşor sub acţiunea radiaţiilor UV, cu formarea de *tiocrom*. Participă în metabolismul glucidelor şi în procesele de fosforilare oxidativă. Este una din vitaminele care stimulează activitatea sistemului nervos şi randamentul intelectual la om, fiind însă indicată şi în unele disfuncţii hepatice, gastro-intestinale şi renale, în psihopatii, hipertiroidie, alcoolism, pentru ameliorarea efectelor secundare provocate de tratamentul îndelungat cu antibiotice şi sulfamide. Lipsa vitaminei B_1 la om provoacă boala *beri-beri*, care se manifestă prin tulburări majore la nivelului SNC şi sistemului nervos periferic, (GROZAV et al., 2001). Alături de alte vitamine din complexul B, tiamina se află în cantităţi mari în drojdia de bere, tărâţa de cereale, în lapte şi ficat. Dintre microorganismele care sintetizează această vitamină se numără în primul rând drojdiile, dar şi unele mucegaiuri din genul *Aspergillus*.

Vitamina B_2 sau *riboflavina* face parte din grupa flavin-enzimelor şi este un derivat de izoaloxazină (fig. 2.2).

Gruparea ribitil din catena laterală asigură stabilitatea, solubilitatea, dar şi obţinerea de enzime şi coenzime prin fosforilare. Sub formă purificată se prezintă ca o pulbere galbenă, galben-portocalie, cu gust amar şi miros slab, mai greu solubilă în apă, dar foarte solubilă în soluţii alcaline.

Scanned with OKEN Scanner



derivat de izoaloxazina

Fig. 2.2. Vitamina B_2

Are un rol important în transportul electronilor în procesul de formare a ATP la microorganisme. În organismele umane şi animale riboflavina intervine în fixarea fierului de către hemoglobină, în metabolismul lipidelor şi glucidelor, fiind recomandată în afecţiuni ale pielii şi mucoaselor (stomatite, dermatite, keratoze, conjunctivite, psoriazis), în ameliorarea vederii, în tulburări de creştere la copii, în cazul terapiei cu sulfamide şi antibiotice etc. Necesarul zilnic de vitamină B_2 este apreeciat la 1-3 mg/zi, care se asigură din activitatea florei intestinale şi din alimentele ingerate, (GROZAV et al., 2001). Se depozitează în ficat unde participă la *sinteza citocromului c*. Producerea de vitamină B_2 este caracteristică pentru numeroase specii de microorganisme (bacterii, drojdii şi mucegaiuri), cele mai bune producătoare fiind ascomycetele *Ashbya gossypii* şi *Eremothecium ashbyii*, care parazitează plante ca bumbacul, cafeaua, tomatele şi citricile. Ele pot produce cantităţi de vitamină care ating până la 700 mg/litru de mediu de cultură. Stabilitatea mai ridicată în producerea de vitamină B_2 a tulpinilor de *A. gosipyii* face ca acestea să fie utilizate mai mult în industria de profil. Pe medii de cultură care au ca sursă de carbon glucoza, zaharoza sau maltoza, iar ca sursă de azot produse de provenienţă animală (cum ar fi apele de abator), la pH neutru şi aeraţie moderată se poate atinge o producţie de riboflavină de 1,75 g/l, (NIMIŢAN, 1992).

Vitamina B_5 sau *acidul pantotenic* rezultă din condensarea acidului pantoic cu β-alanina, (fig. 2.3).

Este implicată în metabolismnul glucidelor, lipidelor, hormonilor steroizi şi hemoglobinei, intrând în structura coenzimei A. Este o vitamină foarte răspândită în lumea animală şi vegetală.

Scanned with OKEN Scanner

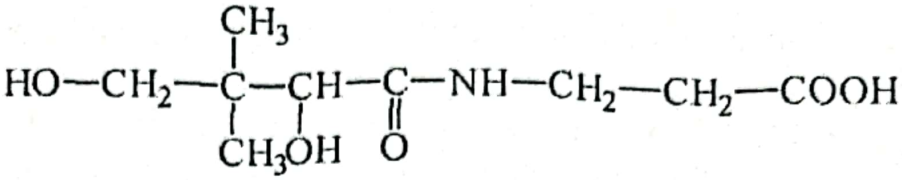


Fig. 2.3. Vitamina B_5

Vitamina B_5 este folosită în combaterea nevritelor periferice, în tratamentul hepatitelor cronice, miocarditei, anginei, aterosclerozei, contribuie la păstrarea integrității pielii, la creşterea şi pigmentarea părului. Poate fi obținută în culturi de *Sporobolomyces holsaticus*.

Vitamina B_{12} sau *ciancobalamina* are în structura ei un inel tetrapirolic (corrina), având în centru un ion de Co^{3+} coordinat prin 4 atomi de azot; sub planul corrinic se află legat un nucleotid dimetilbenzimidazol-ribozo-3-fosfat, iar deasupra planului corrinic o poziție de coordinare (a 6-a) care poate fi ocupată de diferite grupări (-CN, -OH, CH_3 etc). Ciancobalamina prezintă în poziția a 6-a o grupare -CN. De regulă se prezintă ca o pulbere cristalină de culoare roşu-închis, dar şi portocalie (Co^{2+}) sau cenuşie (Co^{+}). Sub forma coenzimelor 5 - deoxiadenozil-cobalamina şi metil-cobalamina, vitamina B_{12} intervine în creşterea şi maturarea celulelor, la realizarea funcției hematogene a măduvei (contribuie la formarea şi regenerarea hematiilor) fiind de aceea cunoscută şi sub numele de "vitamina roşie", participă la sinteza acizilor nucleici, activează enzimele care intervin în detoxifierea ficatului, stimulează creşterea în greutate la copii, asigură o funcționare normală a sistemului nervos şi păstrarea echilibrului psihic la om etc, (GROZAV et al., 2001). Este cea mai importantă vitamină din grupul B, fiind factorul cel mai eficient în prevenirea şi combaterea anemiei şi lipsei de poftă de mâncare. Această vitamină este produsă de către microflora tubului digestiv al rumegătoarelor şi se depozitează în ficat. Necesarul de vitamină B_{12} pentru organismul uman este preluat din alimentele de origine animală. Carența în această vitamină este un fenomen mai rar, necesarul de vitamină B_{12} fiind asigurat din alimentele de origine animală ca: ficat, ouă, lapte, muşchi. În cazul carenței acestei vitamine se instalează în organismul uman anemia pernicioasă, boală care se manifestă complex prin: anemie, sindrom dispeptic dureros, neuropatie.

În natură numeroase microorganisme au capacitatea de biosinteză a vitaminei B_{12}. Ea poate fi extrasă şi din nămolul activ sau din lichidul

Scanned with OKEN Scanner

de fermentație în care se produc unele antibiotice ca streptomicina și aureomicina. Cele mai mari producții de vitamină B_{12} se realizează prin cultivarea pe medii adecvate (care conțin glucoză, hidrolizate de caseină, extracte de drojdii, săruri de cobalt în cantități strict determinate etc) a tulpinilor de *Propionibacterium* (*P. shermanii, P. freundenreichii*). Printre bacteriile care sintetizează această vitamină menționăm speciile: *Bacillus megatherium, B. coagulans, Pseudomonas denitrificans.*

Vitamina C (acidul ascorbic, acidul hexuronic) este lactona acidului 2,3-dienol-L-gulonic, (fig. 2.4).

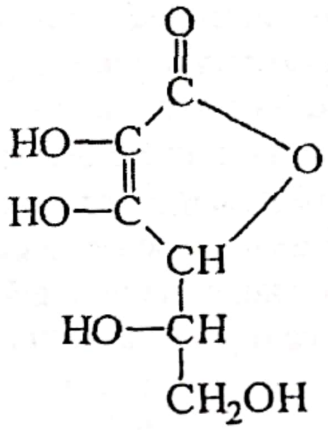


Fig. 2.4. Vitamina C

Are un caracter puternic reducător. Sub formă cristalizată este o vitamină stabilă, fiind foarte sensibilă la oxidanți, la creșterea temperaturii și pH-ului, în prezența ionilor metalelor grele. Vitamina C are capacitatea de a forma în organism un sistem redox activ, fiind implicată în numeroase procese fiziologice și metabolice din organismele vii. Intervine în hidroxilările alifatice, în metabolismul aminoacizilor aromatici, a hormonilor steroizi, în formarea acizilor grași polinesaturați, în formarea colagenului, în metabolismul fierului, în metabolismul glucidelor etc, (GROZAV et al., 2001).

Ea stimulează regenerarea țesuturilor, vindecarea rănilor, sporește rezistența organismului uman la bolile infecto-contagioase - prin stimularea sistemului imunitar, participă la absorbția fierului în organism și la maturarea hematiilor, mărește rezistența capilarelor sanguine și astfel contribuie la stoparea hemoragiilor scorbutice etc. Avitaminoza C provoacă hemoragii (la nivelul mucoasei bucale, gingiilor, tractusului gastro-intestinal, tulburări ale țesutului conjunctiv, iar în forme avansate

Scanned with OKEN Scanner

hemoragii viscerale, gangrenă şi necroze osoase. Această vitamină a fost descoperită în 1927 de A. GYORGYI în cortexul suprarenalelor, fiind mai apoi evidenţiată în sucul de citrice şi în alte fructe şi legume. Necesarul de vitamina C în organismele animale provine din hrana de origine vegetală. Vitamina C poate fi obţinută şi prin cultivarea pe medii adecvate a unor bacterii din genurile *Acetobacter*, *Aerobacter* şi *Pseudomonas*.

Vitaminele D (calciferoli) sunt derivaţi de steroli (fig. 2.5) şi se obţin din provitamine D sub acţiunea radiaţiilor UV.

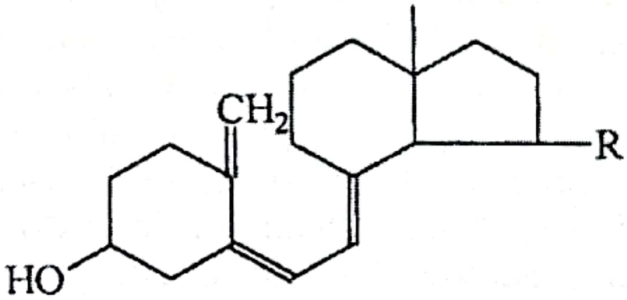


Fig. 2.5. Vitamina D

Din acest grup, cele mai importante sunt vitaminele D_2 şi D_3, care provin din colesterol la animale şi din ergosterol la plante. Vitaminele D au rol esenţial în dezvoltarea dentiţiei şi sistemului osos, întrucât asigură fixarea calciului şi fosforului în organism. Se folosesc în tratamentul rahitismului carenţial, în osteoporoză şi osteomalacie. Vitamina D poate fi obţinută prin iradierea cu lămpi de mercur a unor steroli, în special a ergosterolului produs de unele mucegaiuri, cum ar fi *Aspergillus niger* sau *Penicillium notatum*.

Şi alte vitamine H, K, PP, provitamina A (carotenul) etc, pot fi obţinute prin cultivarea unor microorganisme. Astfel, vitamina H (biotina) este sintetizată de unele organisme din genul *Phycomyces, Torulopsis* şi *Aspergillus,* vitamina K prin cultivarea algei *Chorella* sau a unor bacterii din genul *Bacillus,* vitamina PP în culturi din genul *Corynebacterium,* carotenul în culturi ale unor specii din genul *Mucor* şi *Choanephora*, etc.

Dintre vitaminele enumerate se produc pe cale industrială un număr limitat de vitamine şi în special vitaminele B_2 şi B_{12}.

Scanned with OKEN Scanner

2.2. Biotehnologii pentru producerea antibioticelor

Antibioticele sunt, potrivit definiției date de WAKSMANN (1942), substanțe produse de unele microorganisme care au capacitatea de a inhiba dezvoltarea sau de a distruge alte microorganisme *in vitro* sau *in vivo* (prin sinteza unor substanțe toxice, consumul surselor de gucide, schimbarea pH-ului, a tensiunii superficiale etc). Deşi fenomenul de *antibioză* a fost observat încă de PASTEUR (1889), era antibioticelor a început după 1940. În 1929 FLEMING descoperea *penicilina* (faptul că o cultură de stafilococ auriu era distrusă prin suprainfecția cu *Penicillium notatum*), pentru ca în 1939 FLOREY şi colaboratorii să reuşească izolarea şi purificarea ei sub formă cristalizată şi să-i testeze acțiunea pe animale de experiență infectate cu stafilococi şi streptococi. Ulterior, aveau să fie descoperite streptomicina (în 1943), cloramfenicolul (în 1947), clortetraciclina (în 1948), neomicina (în 1949), eritromicina (în 1952) etc. Producerea industrială a penicilinei în 1941 a fost urmată de cea a streptomicinei în 1946, numărul de antibiotice crescând apoi enorm, fiind apreciat astăzi la circa 5500, din care însă numai unele se fabrică pe scară largă. S-a constatat că bacteriile Gram pozitive sunt mai sensibile la antibiotice decât cele Gram negative. De aceea, atunci când se produc unele antibiotice, colorația Gram este un indiciu important. Această colorație depinde de compoziția peretelui celular al bacteriilor, cele Gram pozitive colorându-se în albastru, iar la cele Gram negative colorația virează din albastru în roşu prin spălare cu alcool.

Producerea unui antibiotic pe scară industrială reclamă costuri ridicate şi de aceea, atunci când se ia o decizie în acest sens, se iau în calcul o serie de proprietăți ale lui ca:

- spectrul antimicrobian (care să fie cât mai larg);
- absența toxicității;
- stabilitatea;
- solubilitatea în apă la un anumit pH;
- toleranța organismelor animale şi umane la administrarea lui;
- absența compuşilor pirogeni şi histaminici din compoziția lor;
- absența efectelor secundare, (PRESCOT, după NIMIȚAN, 1992).

Pentru obținerea de antibiotice se folosesc mai multe modalități:

- prin biosinteză directă, caz în care antibioticul produs prin cultivarea unui microorganism este utilizat ca atare sau pentru semisinteză;

Scanned with OKEN Scanner

- prin biosinteză dirijată, situație în care în mediul de cultură se introduc precursori care contribuie la creşterea randamentului de producție;
- prin semisinteză, caz în care antibioticul natural este supus unor transformări chimice care-i îmbunătățesc proprietățile farmacodinamice;
- prin sinteză totală, procedeu folosit mai rar (în producerea cloramfenicolului, de exemplu) datorită prețului de cost ridicat.

Pentru producerea prin biosinteză a unui antibiotic se parcurg mai multe etape:

a) Se selecționează tulpina producătoare de antibiotic. Prin cicluri repetate de mutație – selecție, se izolează tulpina care produce antibioticul dorit cu randamentul cel mai înalt (şi din ce în ce mai ridicat), care va fi cultivată pe medii adecvate, cât mai ieftine. Tulpinile selecționate se păstrează la temperaturi scăzute, în condiții de sterilitate.

b) Se stabileşte şi prepară mediul de cultură, care este o soluție sau suspensie apoasă ce conține elementele nutritive necesare pentru creşterea şi înmulțirea microorganismului cultivat Mediul de cultură conține o sursă de carbon (glucoză, fructoză, zaharoză, amidon), făină de soia, de porumb, azotați, săruri de amoniu (ca surse de azot), aminoacizi sau polipeptide (ca factori de creşetere pentru unele microorganisme), fosfați, oligoelemente, carbonat de calciu (care asigură creşterea suprafeței de contact al microorganismului cu mediul nutritiv), iar în unele cazuri precursori, sau stimulatori ai procesului de fermentație;

c) Cultivarea propriu-zisă a microorganismului producător (însămânțarea şi fermentarea), care începe în laborator la nivel de eprubetă şi trece treptat în vase de volume tot mai mari până la inoculul pentru fermentatorul final. De regulă, fermentația este aerobă şi în condiții naturale se desfăşoară la suprafață. În momentul de față fermentația se produce "în profunzime" (adică în toată masa mediului de cultură) şi de aceea fermentatoarele sunt prevăzute cu sisteme de agitare energică şi de aerare optimă;

d) Izolarea antibioticului, care presupune o serie de operații pentru extracția lui, precipitarea şi filtrarea, adsorbția pe coloane şi eluarea cu solvenți specifici;

Scanned with OKEN Scanner

e) Purificarea, liofilizarea şi condiţionarea sub o formă farmaceutică a antibioticului, (ZUGRAV et al., 2001).

Cultivarea microorganismelor producătoare de antibiotice se face în condiţii sterile pentru a se evita suprainfecţia cu alţi microbi. Fermentatoarele industriale au volume crescânde, pentru a permite transferul culturii sterile dintr-unul cu capacitate mai mică în următorul având capacitate mai mare, acest transfer efectuându-se cu ajutorul aerului comprimat steril. Orice intervenţie în mediul de cultură şi pe parcursul procesului de fermentaţie pentru introducerea de nutrienţi, precursori, antispumanţi etc, se face prin acelaşi procedeu, pentru a se evita contaminarea culturii. Fermentatoarele sunt fabricate din oţel inoxidabil şi sunt prevăzute cu sisteme de agitare, de aerare, de răcire şi aparate de măsură şi control, pentru respectarea anumitor parametri de producţie. Toate operaţiunile sunt automatizate şi supravegheate permanent de specialişti.

O activitate intensă are loc în laboratorul cu profil microbiologic, care asigură furnizarea inoculului, unde se asigură cultivarea, întreţinerea, conservarea şi ameliorarea continuă a tulpinilor producătoare de antibiotice. Folosind mutageneza experimentală şi selecţia, iar mai nou ingineria genetică, s-au obţinut tulpini cu o capacitate de sinteză tot mai înaltă pentru un anumit antibiotic. Tulpinile selecţionate în prezent de firma Ely Lilly din SUA au o productivitate în penicilină de câteva mii de ori mai mare decât prima tulpină izolată de FLOREY şi colaboratorii în 1941.

Inoculul se prepară în vase de sticlă de capacitate diferită (20-200 litri), cu posibilităţi de agitare şi aerare, în condiţii sterile. De regulă inoculul este transferat apoi într-un recipient metalic (*bazoka)* şi transportat în apropierea fermentatorului de producţie care urmează să fie inoculat, care poate atinge o capacitate de 50 – 100 m^3. Inoculul este introdus în fermentator sub presiune, cu ajutorul aerului sterilizat. În funcţie de condiţiile de cultură şi de microorganismul cultivat, inoculul poate reprezenta între 1 şi 5% din volumul fermentatorului de producţie. Timpul de fermentaţie durează între 3 şi 10 zile. La anumite intervale de timp se scot (în condiţii sterile) probe din fermentator pentru a se urmări evoluţia procesului de fermentaţie.

După expirarea timpului de fermentaţie, mediul de fermentaţie este supus adeseori răcirii şi apoi este transferat în secţia de extracţie,

Scanned with OKEN Scanner

unde se separă mai întâi biomasa microbiană de lichidul de fermentație și unde, în funcție de antibioticul produs, au loc o serie de operațiuni ca: extracția cu solvenți, precipitarea, purificarea produsului (înlăturarea substanțelor pirogene și histaminice), sterilizarea lui etc.

Antibioticele sunt clasificate funcție de biogeneza lor sau de structura chimica. În primul caz, ele se împart în: a) antibiotice derivate din aminoacizi (dintr-un aminoacid cum ar fi cloramfenicolul; din 2-3 aminoacizi, cum ar fi beta-lactaminele; din mai mulți aminoacizi – antibiotice polipeptidice); b) antibiotice derivate din monozaharide (aminoglicozidele); c) antibiotice derivate din unități de acid acetic sau propionic (macrolide, tetracicline, lincozamine). În funcție de structura lor chimică, antibioticele au fost clasificate în: a) beta-lactamine; b) macrolide; c) pseudomacrolide; d) lincozamine; e) polipeptide; f) tetracicline; g) fenicoli; h) aminoglicozide, (ZUGRAV et al., 2001).

În ultimele 5-6 decenii, antibioticele au devenit indispensabile actului medical, gama lor diversificându-se continuu. Printre cele mai comercializate antibiotice se numără penicilinele, cefalosporinele, streptomicinele și tetraciclinele. După unele aprecieri, producția anuală de antibiotice în lume depășește cifra de 25.000 tone.

Antibioticele și-au găsit și alte aplicații decât cele din domeniul sănătății omului și animalelor. Întrucât miceliile sau mediile epuizate, pe care au fost cultivate unele microorganisme producătoare de antibiotice, conțin factori de creștere pentru animale, s-au elaborat rețete de furaje în care sunt încorporate aceste „reziduuri" de la fabricarea antibioticelor. Unele antibiotice sunt de asemenea folosite în tratamentul anumitor boli la plante, la conservarea unor produse industriale și chiar alimentare etc.

2.2.1. Producerea penicilinelor

Tulpina producătoare de penicilină descoperită de FLEMMING în 1929 aparținea speciei *Penicillium notatum*, se cultiva la suprafață și furniza o cantitate mică de antibiotic, doar câteva unități/l mediu. După 1946 s-a trecut la cultura în profunzime, iar prin lucrări sistematice de ameliorare a capacității de biosinteză a penicilinei (cicluri de mutageneză experimentală și selecție), s-au izolat tulpini tot mai productive. În 1956 a fost izolată tulpina Q176 de *P. chrysogenum*, care a fost continuu ameliorată în privința productivității, atingând astăzi cca 4000 de unități de penicilină/ml. Această tulpină prezenta și avantajul că nu producea

Scanned with OKEN Scanner

crysogeină, un pigment galben care ridică o serie de probleme în procesul de extracție a antibioticului.

Genul Penicillium produce 6 tipuri de peniciline naturale, care conțin acidul 6-aminopenicilamic (fig. 2.6), ce provine din condensarea unei molecule de D-valină cu una de dimetil-cisteină, din care rezultă un nucleu β-lactamic şi unul tiazolidinic (tabelul 2.1).

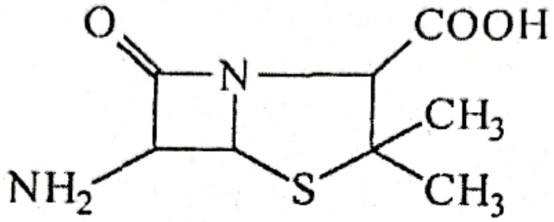


Fig. 2.6. Acid 6-aminopenicilamic

Tabelul 2.1. Principalele peniciline

R	D.C.I.	Denumire uzuală
C_6H_5-CH_2	Benzilpenicilina	Penicilina G
C_6H_5O-CH_2	Fenoximetilpenicilina	Penicilina V
HO-C_6H_4-CH_2	p-Hidroxi- benzilpenicilina	Penicilina X
CH_2-$(CH_2)_5$-CH_2	Heptilpenicilina	Penicilina K
CH_3-CH_2-CH=CH- CH_2	Pentenilpenicilina	Penicilina F
CH_3-$(CH_2)_3$-CH_2	Pentilpenicilina	Dihidropenicilina F
HOOC-$CH(NH_2)$-$(CH_2)_2$-CH_2	□-Aminoadipoilpenicilina	Penicilina N

Formula generală a unei peniciline este redată în figura 2.7, iar cea mai simplă penicilină în figura 2.8.

Penicilinele diferă prin catena laterală ataşată în poziția a 6-a printr-o funcție amidică. Prima penicilină fabricată şi comercializată a fost *penicilina G* (fig. 2.9) - care are ataşat un radical benzil, apoi *penicilina V* (fig. 2.10) - care are ataşat un radical fenoximetil etc.

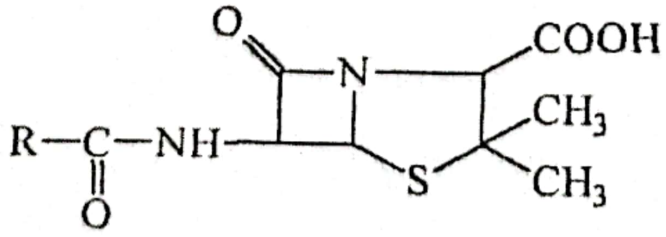


Fig. 2.7. Formula generală a penicilinei

Scanned with OKEN Scanner

Pentru sinteza catenei laterale se introduce în mediul de cultură precursori specifici. În cazul penicilinei G, precursorul este acidul fenil-acetic (C_6H_5-CH_2- COOH).

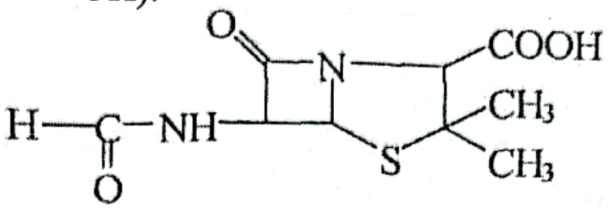


Fig. 2.8. Cea mai simplă penicilină

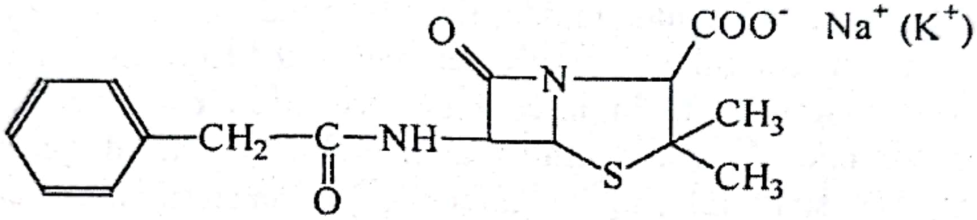


Fig. 2.9. Penicilina G

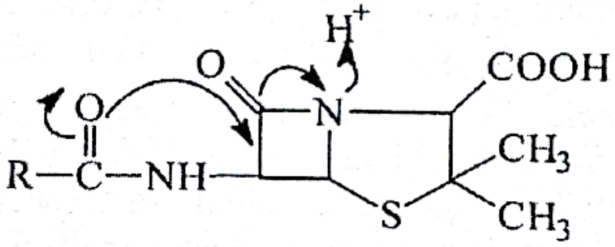


Fig. 2.10. Penicilina V

Activitatea antibiotică a penicilinei G poate fi redusă sau chiar compromisă de către enzima specifică - *penicilinaza*. Astfel se explică creşterea rezistenței unei bacterii infecțioase la acțiunea penicilinei şi de aici necesitatea obținerii unor generații noi de peniciline sau a altor antibiotice. S-a constatat în 1953 că *P. chrysogenum* producea în absența precursorului o substanță fără activitate antibiotică, dar sensibilă la penicilinază, care s-a dovedit a fi acidul 6-aminopenicilanic. Funcția lui amino poate fi acilată pe cale chimică şi de aici posibilitatea producerii de peniciline noi de semisinteză. Dintre penicilinele de acest fel, cele mai cunoscute sunt: oxacilina, ampicilina, carbenicilina, meticilina etc.

Formulele de mediu utilizate în biosinteza industrială a diverselor antibiotice sunt ținute în secret de către producători. Se ştie totuşi că, în cazul penicilinelor este absolut necesară prezența în mediu a lactozei.

Scanned with OKEN Scanner

Mediile de cultură pentru peniciline conţin de asemenea o sursă de azot (constituită din extracte de porumb), glucoză, carbonat de calciu şi fosfat monopotasic (folosite pentru tamponarea mediilor nutritive) etc. Precursorul penicilinei G, acidul fenil-acetic, se introduce în cursul fermentaţiei, într-o concentraţie de 0,01-0,05% din cantitatea de mediu de fermentaţie. Pentru fabricarea penicilinei este necesară o aerare puternică, fapt ce determină o spumare abundentă. Acest inconvenient reclamă intervenţia cu agenţi antispumanţi (uleiuri vegetale).

Penicilina se fabrică fie sub formă de sare - caz în care este hidrosolubilă şi are o acţiune rapidă, fie sub formă aminată - caz în care este mai puţin solubilă şi are efect întârziat: (procain-penicilina). Penicilinele sunt indicate în infecţii bacteriene cu evoluţie rapidă şi severă şi acţionează prin distrugerea peretelui celular al germenilor patogeni. Ele sunt folosite în infecţiile cu bacterii din genurile: *Streptococcus, Staphylococcus, Neisseira*, împotriva agentului sifilisului (*Treponema sp.)* etc.

2.2.2. Producerea cefalosporinelor

Cefalosporinele sunt antibiotice produse de mucegaiul *Cephalosporium acremonium* şi au în moleculă un nucleu asemănător cu acidul 6-aminopenicilamic şi anume acidul 7-aminocefalosporinic, fapt ce le conferă proprietăţi şi un mecanism de acţiune asemănător. În figura 2.11 este prezentată structura chimică a cefalosporinei C.

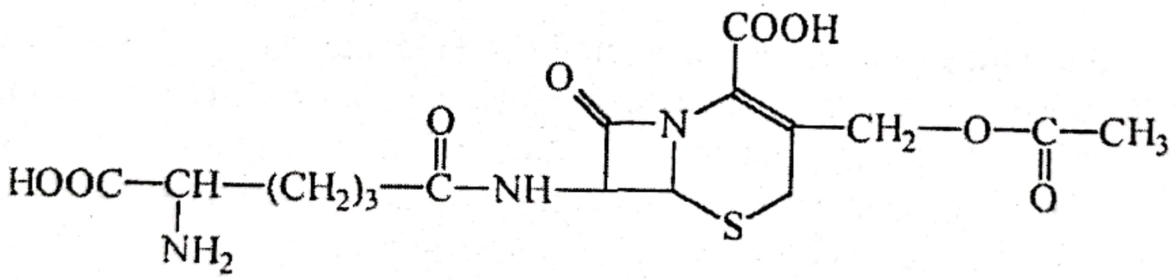


Fig. 2.11. Cefalosporina C

Faţă de peniciline, cefalosporinele sunt mai stabile şi au o rezistenţă mai ridicată la β-lactamază. În funcţie de structura chimică şi activitatea lor biologică, cefalosporinele au fost clasificate în 3 categorii (generaţii): cele din prima generaţie (*cefalotina, cefaloridina, cefalexina, cefazolina*) sunt active în infecţiile cu coci Gram pozitivi (stafilococul

Scanned with OKEN Scanner

auriu, streptococul, pneumococul) şi negativi (meningococul, gonococul), bacili gram pozitivi (*Clostridium perfringens*) şi negativi (*Proteus*, *Klebsiella*, *E. coli*); cefalosporinele din generaţia a II-a (*cefamandol, cefuroxim, cefaclor*) au spectrul de acţiune deplasat spre bacilii gram negativi, fiind recomandate în pneumonii şi sinuzite rezistente la peniciline, în infecţii mixte etc; cefalosporinele din generaţia a III-a (*cefotaxim, cefsulodin, ceftazidim, cefoperazon*) sunt eficiente în infecţiile cu o serie de bacili gram negativi, enterobacterii etc, fiind utilizate în meningite, pneumonii, infecţii cu *Pseudomonas*.

2.2.3. Producerea antibioticelor aminoglicozidice

Antibioticele din această grupă se caracterizează prin prezenţa în molecula lor a aminoozelor, care sunt legate glicozidic de streptidină sau 2-dezoxistreptamină (derivaţi de 1,3-diaminoinozitol). Proprietăţile lor chimice şi activitatea antimicrobiană depind de agliconul specific şi de modul de dispunere a radicalilor legaţi glicozidic. Aceste antibiotice sunt solubile în apă, au caracter bazic, un spectru antimicrobian larg, dar au utilizare limitată datorită toxicităţii lor. În funcţie de natura agliconului, sunt de 2 categorii: aminoglicozide cu aglicon streptidinic (streptomicina, dihidrostreptomicina, hidroxi-streptomicina) şi aminoglicozide cu aglicon dezoxistreptaminic (kanamicina, neomicina, gentamicina, paromomicina etc). Sunt antibiotice produse de actinomicetele din genul *Streptomyces*.

Cel mai reprezentativ antibiotic din grup este *streptomicina,* descoperită de WAKSMANN în 1944 în cercetări la *S. griseus*. Molecula de streptomicină e formată din trei componente: streptidină şi N-metilglucozamină, care sunt legate între ele prin punţi glicozidice, (fig. 2.12). Streptomicina este o substanţă solidă, cristalină, solubilă în apă, mai stabilă ca penicilina.

Producerea streptomicinei are loc industrial numai prin biosinteză, în mod asemănător cu penicilina, numai că sursa de carbon o reprezintă glucoza, a cărei concentraţie trebuie riguros controlată în mediul de cultură pentru evitarea dezvoltării excesive a miceliului în detrimentul sintezei de antibiotic. În mediul de cultură se mai include făina de soia, reziduuri solubile de distilerie, clorură de sodiu, uleiuri vegetale (ca antispumanţi) etc, fermentaţia având loc la un pH optim de 7,6-8,0.

Scanned with OKEN Scanner

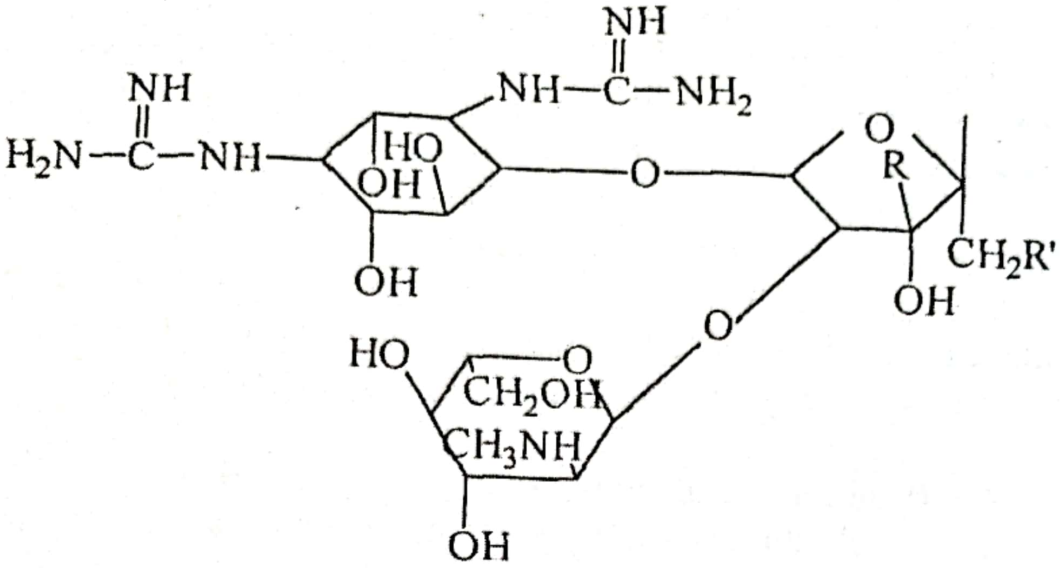


Fig. 2.12. Streptomicina

R	R'		
-CHO	-H	=>	Streptomicina
$-CH_2OH$	-H	=>	Dihidrostreptomicina
-CHO	-OH	=>	Hidroxistreptomicina

Tulpinile de *Streptomyces* sunt mai rezistente decât cele de *Penicillium* la contaminarea cu bacterii, dar mai sensibile la cele cu fagi. S-au selecţionat de aceea tulpini care, pe lângă productivitate înaltă în sinteza antibioticului, sunt şi fagorezistente. După expirarea timpului de fermentaţie (5-6 zile), miceliul se separă de mediul de cultură prin filtrare pe Kiselgur, apoi au loc procesele de extracţie a antibioticului, destul de complicate. Având caracter bazic, streptomicina formează săruri cu diverşi acizi, fapt ce permite separarea ei pe răşini schimbătoare de ioni.

Mecanismul de acţiune a antibioticelor aminoglicozidice este inhibarea sintezei proteinelor bacteriene. Ele sunt indicate în infecţiile cu germeni Gram (-) şi cu stafilococii producători de penicilinază. Streptomicina s-a dovedit cel mai eficient antibiotic împotriva agentului tuberculozei (*Mycobacterium tuberculosis).* Împreună cu penicilina se administrează în tratarea unui număr mare de infecţii. Streptomicina este eficientă şi în tratarea endocarditelor, speticemiilor, infecţiilor urinare. Se utilizează şi local sub formă de pulbere, unguente, colire. Atenţie la folosirea ei internă, deoarece prezintă oto- şi nefrotoxicitate.

Scanned with OKEN Scanner

Aşa cum precizam anterior, din această grupă fac parte şi alte antibiotice cunoscute. *Neomicina* (fig. 2.13) de exemplu, este produsă în culturi de *S. fradiae*, fapt pentru care se mai numeşte şi framicetină. Este un antibiotic eficient în tratarea infecţiilor cu germeni Gram pozitivi şi negativi, are o nefrotoxicitate ridicată şi de aceea se foloseşte mai mult local.

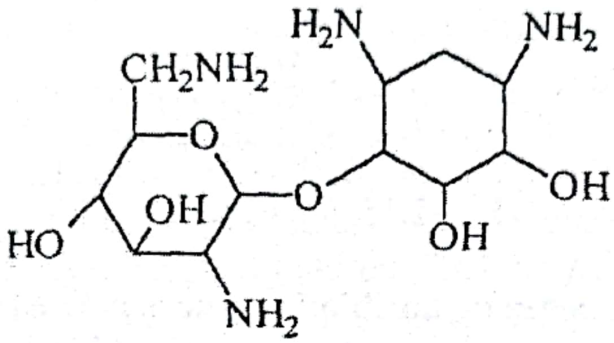
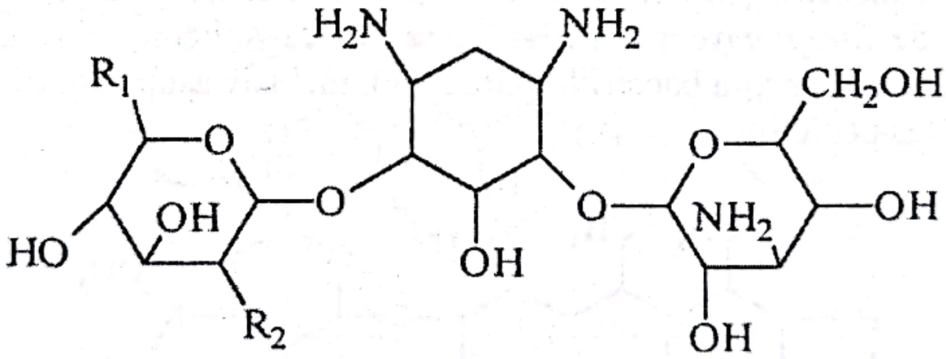


Fig. 2.13. Neomicina

Kanamicina (fig. 2.14) a fost izolată din culturi de *S. kanamiceticus*. Este un tuberculostatic mai slab. Se foloseşte parenteral în infecţii sistemice, oral în infecţii digestive, precum şi local.

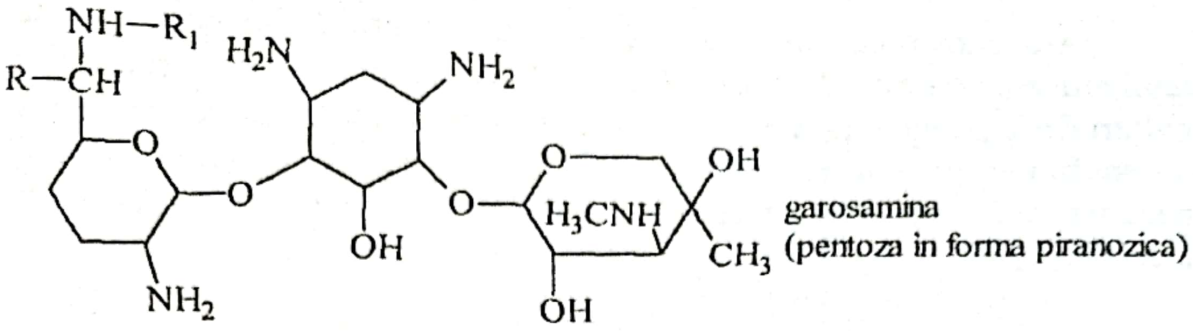


R_1=CH_2NH_2	R_2=OH	Kanamicina A
R_1=CH_2NH_2	R_2=NH_2	Kanamicina B
R_1=OH	R_2=CH_2NH_2	Kanamicina C

Fig. 2.14. Kanamicina

Gentamicina (fig. 2.15) a fost descoperită în culturi de *Micromonospora purpurea*, este eficientă în doze mici şi se foloseşte parenteral în infecţii urinare grave şi septicemii.

Scanned with OKEN Scanner



R_1=R=CH_3 => Gentamicina C_1
R_1=CH_3; R_1=H => Gentamicina C_2
R=R_1=H => Gentamicina C_{1a}

Fig. 2.15. Gentamicina

2.2.4. Producerea de antibiotice macrociclice (macrolide)

Sub această denumire sunt cuprinse antibiotice produse tot de streptomicete, care au însă în structura lor un ciclu lactonic mare, de care se leagă glicozidic oze sau aminooze mai puțin obișnuite, cum ar fi: *cladinoza, micaroza, oleandroza* etc. Din această categorie fac parte printre altele: *eritromicina, spiramicina, josamicina, oleandomicina* etc, antibiotice care inhibă sinteza proteinelor la microorganismele patogene. Cea mai cunoscută şi folosită dintre acestea este *eritromicina*, (fig. 2.16) produsă de *Streptomyces erythreus*,care are ca aglicon *eritronalida* şi care acționează asupra bacteriilor Gram (+), inclusiv asupra stafilococilor rezistenți la penicilină.

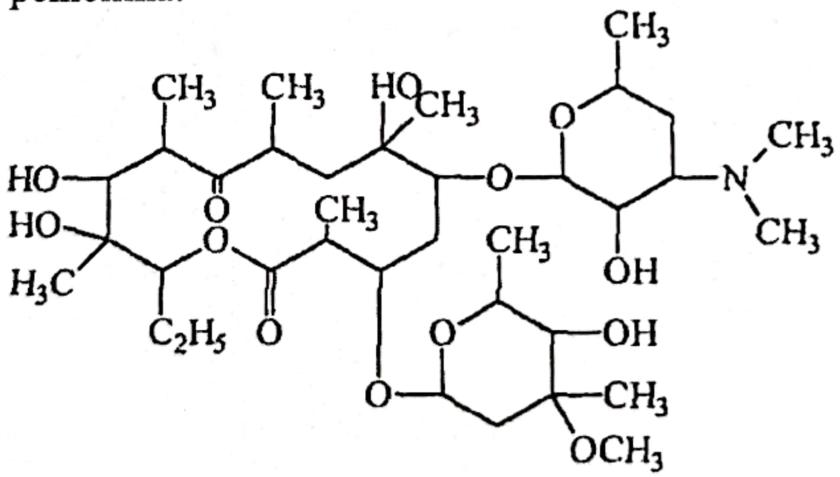


Fig. 2.16. Eritromicina

Se folosește sub formă de propionat de eritromicină, fiind bine tolerată de organismul uman, în special pentru tratarea infecțiilor

Scanned with OKEN Scanner

respiratorii şi digestive. Spiramicina sau rowamicina este produsă de *S. ambofacines* şi este folosită în special în infecţiile dentare, dar şi în infecţii ale căilor respiratorii superioare şi ale căilor biliare.

Dintre antibioticele macrociclice fac parte şi *nistatina* şi *amfotericina*, care inhibă dezvoltarea ciupercilor microscopice prin modificarea permeabilităţii membranelor lor. În această categorie au fost incluse şi unele antibiotice precum *rifampicina, lincomicina, vancomicina* etc, care au o structură chimică diferită de a macrolidelor, dar au o acţiune asemănătoare (puternic antistafilococică) şi care sunt denumite *pseudomacrolide*. Dintre acestea mai cunoscută este *rifampicina* (fig. 2.17) sau *sinerdolul*, un antibiotic de semisinteză, folosit în tratarea formelor rezistente de tuberculoză, în infecţiile cu stafilococ, pneumococ, dar şi în cele cu *Bacillus fragilis* rezistente la penicilină, iar în combinaţie cu eritromicina în infecţiile cu *Legionella* şi *Neisseria*.

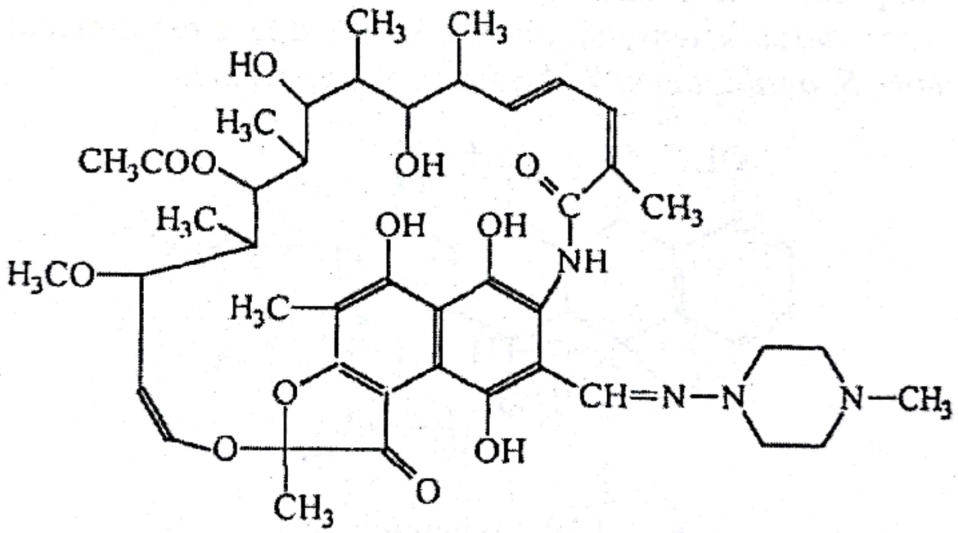


Fig. 2.17. Rifampicina

2.2.5. Producerea de antibiotice cu nucleu chinonic

Din această grupă fac parte tetraciclinele, antibiotice care au ca nucleu de bază *tetracenul* sau *naftacenul* (fig. 2.18), au un spectru larg de acţiune şi sunt utilizate împotriva infecţiilor cu bacterii Gram (+) şi (-), a richetsiilor şi amoebelor. Pot forma cu acizii, săruri. Sunt produse de bacterii din genul *Streptomyces*.

În anul 1948 a fost descoperită *clortetraciclina* sau *auromicina*, sintetizată de *S. aureofaciens*. Mediul de cultură pentru acest

Scanned with OKEN Scanner

microorganism este constituit din amidon, melasă, făină de soia, extract de porumb, carbonat de calciu, clorură de sodiu, cantităţi mici de microelemente (Cu, Zn, Mn) etc, iar ca antispumanţi se folosesc grăsimea de porc în amestec cu octadecanolul.

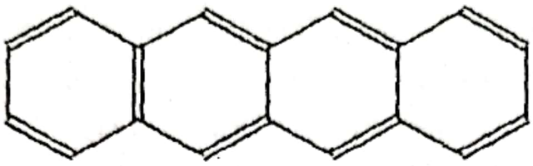


Fig. 2.18. Tetracen

În 1950 s-a descoperit *oxitetraciclina* (fig. 2.19) sau *teramicina*, produsă de către *S. rimosus*, dar şi de alte streptomicete. *Tetraciclina* propriu-zisă a fost izolată în 1953 (după clor- şi oxi-tetraciclină) prin fermentaţia produsă în anumite condiţii de cultură (riguros controlate) cu *Streptomyces aureofaciens*, şi ulterior şi cu alte streptomicete ca: *S. viridifaciens, S. antibioticus, S. flaveolus, S. parvus* etc.

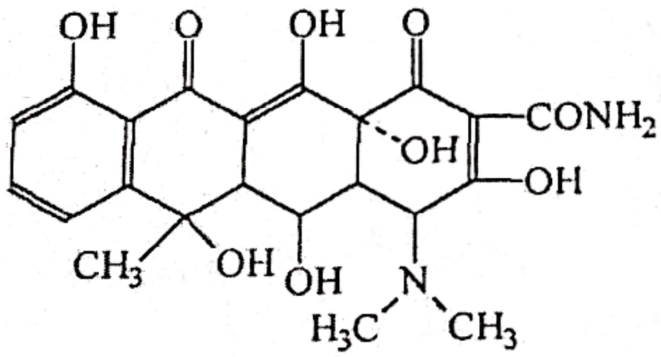


Fig. 2.19. Oxitetraciclina

Tetraciclinele au aspectul de pulberi cristaline de culoare galbenă, solubile în acizi şi alcali, dar solubile în apă. Spectrul lor de acţiune cuprinde coci gram pozitivi şi negativi, bacili gram pozitivi şi negativi, vibrionul holerei, unele protozoare, fiind ineficiente pentru infecţiile cu *Salmonella*, *Pseudomonas*, fungi, bacilul lui Koch. Se folosesc şi în diagnosticul unor forme de cancer datorită acumulării lor în tumori şi evidenţierii acestor aglomerări în lumină UV. Tetraciclinele nu se recomandă gravidelor şi copiilor sub 7 ani, deoarece fixează calciul, influenţând în acest fel dezvoltarea osoasă, (GROZAV et. al., 2001). Sunt administrate de regulă pe cale orală. Pot fi utilizate şi local, pe piele

Scanned with OKEN Scanner

şi mucoase, sub formă de unguente, colire, spray-uri, supozitoare, ovule etc.

În afara efectului lor terapeutic la om şi animale, tetraciclinele şi-au găsit aplicaţii şi în zootehnie. Administrate în cantităţi mici în hrana animalelor (5-20 g la tona de furaj), ele contribuie la stimularea creşterii animalelor, la îmbunătăţirea stării de sănătate, la prevenirea unor enterite bacteriene etc, (MILICĂ, 1991).

2.2.6. Producerea de antibiotice cu nucleu aromatic

În această categorie intră o serie de antibiotice ca: *cloramfenicolul, griseofulvina, novobiocina, mitomicina, puromicina, mitomicina, actinomicina* etc. Cel mai cunoscut şi utilizat dintre aceste antibiotice este cloramfenicolul (fig. 2.20), descoperit în 1947 într-o cultură de *Streptomyces venezuelae.* În prezent este produs exclusiv prin sinteză.

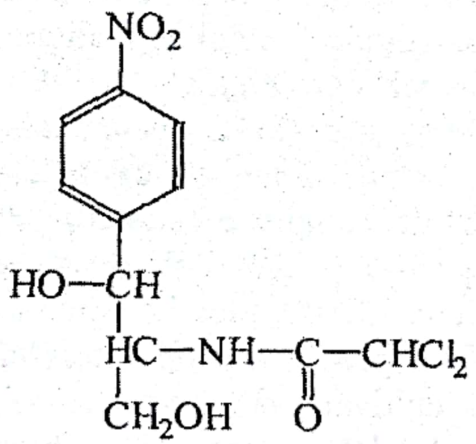


Fig. 2.20. Cloramfenicolul

Apare ca o pulbere microcristalină, alb-gălbuie, cu gust foarte amar, mai greu solubilă în apă, dar solubilă în propilenglicol şi formamidă. Are o stabilitate ridicată şi un spectru de acţiune larg, fiind un antibiotic electiv în infecţiile cu *Salmonella*, dar ineficient în infecţiile cu *Pseudomonas*, micobacterii, protozoare şi fungi. Nu se administrează copiilor nou-născuţi şi mamelor care alăptează. Mecanismul de acţiune asupra microorganismelor patogene constă în inhibarea sintezei proteinelor. Structura chimică, relativ simplă, a cloramfenicolului a permis obţinerea lui pe cale sintetică.

Scanned with OKEN Scanner

2.3. Culturile de țesuturi și celule animale și implicațiile lor biotehnologice

În anii 1950 ai secolului trecut s-au făcut primii pași în culturile *in vitro* de țesuturi și celule animale și umane și primele avantaje ale acestei tehnici nu au întârziat să se arate. Între timp s-au elaborat numeroase metode de acest gen: culturi de embrioni, de fragmente de organe, de țesuturi, dar și de celule obținute prin digestie enzimatică din țesuturi proaspete. Culturile de țesuturi și celule pot fi de două tipuri:

a) *culturi primare* - care au o durată de viață limitată și se obțin prin digestia enzimatică a fragmentelor de țesuturi;
b) *culturi repicabile*, adaptate la condițiile de cultivare *in vitro*, care au capacitatea de proliferare nelimitată.

Culturile primare tripsinizate se obțin frecvent din țesuturi embrionare (dermice, musculare, pulmonare, renale etc). Astfel de culturi se pot realiza și din țesuturi malignizate, care au o viteză de creștere și multiplicare superioară. Totodată, celulele maligne trec mai ușor în linii celulare repicabile decât cele embrionare.

Cultivarea celulelor animale se poate realiza pe medii naturale, constituite din plasmă, lichide biologice, extracte tisulare etc, dar și pe medii sintetice, extrem de complexe (numărul ingredientelor fiind de peste 50), care conțin printre altele: o soluție salină echilibrată, glucoză, aminoacizi, vitamine etc. Dintre mediile sintetice mai utilizate sunt mediile: *Eagl, VME, MacCoy, RPMI, Fisher* etc, (VIESTURS et al 1991).

Celulele pot fi cultivate la suprafață - în monostrat, sau în suspensie. Cultivarea celulelor în suspensie în bioreactoare asigură cele mai uniforme condiții de nutriție și aerare, această tehnică fiind însă eficientă numai pentru culturile de leucocite și cele transformate (Hela, KB, BHK-21 etc.).

Bioreactoarele pentru culturi de celule în suspensie trebuie să asigure o agitare optimă a mediului, dar și păstrarea integrității și viabilității celulelor. Pentru cultivarea celulelor s-au imaginat diverse metode ca: sub formă de peliculă staționară pe suporturi de sticlă, sfere, granule de sefadex și plastic, metoda rolelor (culturi pe cilindri care se rotesc) etc.

Culturile *in vitro* de țesuturi și celule animale și umane reprezintă modele necesare pentru elucidarea unor probleme teoretice care se referă la: diferențierea celulelor și țesuturilor, malignizarea celulelor, reglarea

Scanned with OKEN Scanner

stării normale şi patologice a celulelor, natura şi proprietăţile celulelor imunocompetente, studiul fenomenelor de membrană etc. Cel puţin la fel de importante sunt implicaţiile practice ale acestor tehnici. Ele au devenit instrumente extrem de utile în obţinerea preparatelor de virusuri, în diagnosticarea infecţiilor virale, în profilaxia medicală umană şi veterinară, în obţinerea de substanţe fiziologic active specifice *(hormoni)* şi nespecifice *(lizozim, prostaglandine),* a substanţelor imunomodulatoare *(interleukine, interferoni),* în evidenţierea efectelor farmacologice ale unor medicamente etc. În virusologie, de exemplu, culturile de celule animale şi umane asigură reproducerea virusurilor, analiza factorilor care influenţează infecţiile virale, studiul efectelor citopatologice ale virusurilor. În culturile de fibroblaste la om (în care se află receptori pentru insulină, pentru glicocorticoizi şi unii neuromediatori), prin studiul activităţii unei enzime specifice (*monoaminoxidază),* se pot obţine informaţii asupra unor boli neuro-psihice, (VIESTURS et al., 1991).

Un impact cu totul special pentru medicină a avut descoperirea interferonilor, substanţe de natură glicoproteică, considerate la început ca vând doar proprietăţi antivirale, dar care ulterior s-au dovedit a fi factori universali de rezistenţă nespecifică a organismului uman, care au şi efecte imunomodulatoare şi antiproliferative. Interferonii la om sunt de 3 categorii:

a) *interferon* α, produs de leucocite;

b) *interferon* β, produs de fibroblaste;

c) *interferon* γ, produs de limfocitele T.

Efectul antiviral al interferonilor ar consta fie în blocarea translaţiei informaţiei genetice din ARNm viral, fie chiar a transcrierii acestuia. Interferonii stimulează activitatea limfocitelor T.

După descoperirea interferonilor şi a proprietăţilor acestora s-au căutat metode pentru obţinerea lor experimentală în scopul utilizării terapeutice. Pentru obţinerea interferonului α, CANTELL et. al. (1974) au elaborat o metodă de cultivare în suspensie a leucocitelor umane de la donatorii de sânge, care au fost apoi infectate cu *virusul Sendai* – care reprezintă inductorul. Pentru obţinerea interferonului β se utilizează culturi de fibroblaste şi celule amniotice, iar factorii de inducere sunt reprezentaţi de unele substanţe chimice (clorochinonă, β - diclor-ribofuranozilbenzimidazol, roşu neutru), radiaţii UV etc. Pentru

Scanned with OKEN Scanner

producerea interferonului γ, limfocitele T trebuie activate, acțiunea fiind realizată cu factori mitogeni ca: fitohemaglutinina, enterotoxina stafilococică, serul antilimfocitar etc. Este totodată necesară prezența macrofagelor care furnizează factorul de activare a limfocitelor-T, denumit *interleukonul-1*. După descoperirea tehnologiei ADN recombinant, interferonii au fost produşi prin manipularea genetică a bacilului colic sau a altor microorganisme, cum vom constata într-un alt capitol.

Dezvoltarea căpătată în ultimele decenii de către culturile de țesuturi şi celule animale şi-a găsit aplicații şi în transplantul acestora de la un organism la altul. În cazul leucemiilor, de exemplu, se recurge la transplantul de măduvă osoasă. Deşi este încă la început, acest domeniu este de mare perspectivă. S-au pus la punct metode pentru stocarea celulelor vii în azot lichid şi folosirea lor atunci când este nevoie, precum şi pentru înmulțirea unor celule în condițiile cultivării *in vitro*, ("bancă dinamică").

Culturile de țesuturi şi celule animale au avut un impact deosebit şi în obținerea de vaccinuri.

2.4. Producerea vaccinurilor

De la realizarea primului vaccin viu împotriva unei boli infecțioase au trecut peste 120 de ani. În 1881, ilustrul microbiolog francez L. PASTEUR obținea un vaccin împotriva antraxului prin cultura agentului bolii o perioadă de timp diferită (12 şi 24 de zile) la temperatura de 42^0C, acțiune care a dus la obținerea a două tulpini diferite: una mai virulentă (cea cultivată timp de 12 zile) şi una cu virulență scăzută (cultivată 24 de zile). În 1885 PASTEUR salva de rabie un copil, folosind un vaccin viu prelevat din măduva de iepure inoculat cu virusul rabic de la o vacă turbată. Într-un interval de 3 ani, care au urmat, au fost tratate în acest fel 5374 de cazuri, din care doar 1% fără succes, (SASSON, 1993). Marele savant a intuit şi demonstrat o metodă prin care puteau fi salvate de la moarte sigură sau de la handicapuri severe (în cazul supraviețuirii) milioane de vieți omeneşti.

Vaccinurile sunt preparate cu caracter imunoprofilaxic (mai rar terapeutic). Administrate unui organism animal sau uman, ele induc o imunitate activă dobândită față de agenții infecțioşi din care au fost obținuți (bacterii, ricketsii, virusuri). După modul de preparare,

Scanned with OKEN Scanner

vaccinurile pot fi: vaccinuri vii, vaccinuri capsulare inactivate, vaccinuri chimice (moleculare), vaccinuri asociate (anatoxine), vaccinuri realizate din antigeni artificiali etc, (VIESTURS et al., 1991).

Vaccinurile vii sunt tulpini ale unor microorganisme patogene care au suferit modificări genetice ce le-a afectat virulența. Ele își păstrează capacitatea de înmulțire, de infecție, dar au o virulență atenuată. Organismele vaccinate produc anticorpii împotriva agentului infecțios, dar nu contractează boala specifică. Ca metode de obținere a tulpinilor atenuate se folosesc:

- selecția acestor tulpini din mutanți apăruți spontan;
- cultivarea îndelungată în condiții nefavorabile a agentului infecțios;
- transferul agentului infecțios la un animal nespecific (metoda adaptării la o gazdă nouă);
- intervenția cu agenți mutageni fizici și chimici;
- obținerea de recombinanți genetici cu virulență scăzută.

Fără a intra în amănuntele unui domeniu extrem de vast și important, subliniem faptul că de la primul vaccin viu (împotriva antraxului) preparat de către PASTEUR în 1881, s-au obținut vaccinuri vii împotriva tularemiei, rabiei, brucelozei, bacilului tuberculozei (BCG), tifosului exantematic, ciumei, poliomielitei, rujeolei, oreionului, gripei, vărsatului de vânt etc. După izolarea tulpinilor microbiene utilizate în vaccinare este necesară conservarea însușirilor acestora, operație realizată prin liofilizarea lor.

Liofilizarea reprezintă congelarea produsului la temperaturi cuprinse între –20 și -80^0C, după care urmează sublimarea apei, prin creșterea treptată a temperaturii la +10, $+20^0$C, în condiții de vid înaintat. O lungă perioadă de timp biomasa bacteriană necesară preparării vaccinurilor era obținută prin cultivarea pe medii solide. S-a constatat însă că prin cultivarea bacteriilor în culturi în suspensie în bioreactoare de oțel inoxidabil (în condiții de aerare și temperatură optime), într-un timp foarte scurt (6-12 ore) se pot obține densități de peste 40 miliarde celule/mililitrul de mediu nutritiv. Urmează apoi liofilizarea biomasei, controlul sterilității bacteriilor și al calității preparatului obținut etc, (VIESTURS et al., 1991).

Vaccinurile antivirale se obțin în culturi de țesuturi animale, sau prin înmulțirea lor în organismele animale. Lucrările de acest gen au

Scanned with OKEN Scanner

început cu experienţele lui ENDERS et al. (1949) care au evidenţiat posibilitatea de înmulţire a virusului poliomielitei în ţesuturi extraneurale umane. În producerea de vaccinuri virale se folosesc culturi primare tripsinizate şi linii celulare diploide cultivate monostrat. În acest sens sunt utilizate culturi primare de celule renale de maimuţă pentru producerea vaccinurilor împotriva poliomielitei, rujeolei, variolei. Culturile de celule renale de cobai şi câine se folosesc la prepararea vaccinurilor contra rubeolei, pojarului, parotiditei epidemice. Pentru realizarea vaccinurilor antigripale sunt folosite culturi celulare primare de origine aviară (ţesuturi embrionare de prepeliţe, găini, raţe). Cultura de celule diploide umane WI-38 este utilizată în producerea vaccinurilor împotriva pojarului, rubeolei, poliomielitei, variolei, turbării etc.

În cazul vaccinurilor *cu germeni inactivaţi* (*corpusculari*) cu ajutorul agenţilor fizici (temperatură, UV) sau chimici (formaldehidă, acetonă, fenol, alcool, metale grele) sunt omorâţi agenţii biologici (bacterii, ricketsii), care îşi păstrează însă caracterul corpuscular. Prin această tehnică s-au obţinut vaccinuri profilactice împotriva febrei tifoide (prin tratarea agentului biologic cu alcool), a tusei convulsive (bacteriile sunt omorâte cu formalină), a leptospirozei (inactivare prin încălzire) a holerei (inactivare prin temperatură sau cu formalină) etc. Alături de vaccinurile profilactice cu microorganisme inactivate s-au obţinut vaccinuri curative (pentru tratarea bolilor infecţioase cronice), în acest caz utilizându-se culturi bacteriene şi virale (inactive), care au fost izolate de la bolnavul ce urmează să fie tratat. În categoria vaccinurilor curative intră vaccinul antistafilococic (folosit în furunculoze, abcese, flegmoane, piodermite), vaccinul antigonococic (pentru gonoree, epididimite, anexite, artrite gonococice etc), vaccinul antidizenteric (folosit în tratarea dizenteriilor cronice), vaccinul antiherpetic, etc.

Începând din deceniul al IV-lea al secolului trecut au fost obţinute prin biosinteză sau sinteză chimică *vaccinurile chimice*, denumite şi *moleculare*. Dezvoltarea biologiei şi geneticii moleculare a permis izolarea antigenilor protectori, aflaţi la suprafaţa microorganismelor, în peretele celular şi chiar în produsele extracelulare ale acestora. Ei sunt polimeri macromoleculari de tipul glicoproteidelor sau complexe formate din proteine, polizaharide şi lipide. Pentru obţinerea lor pe cale biosintetică se foloseşte cultura pe medii adecvate, în anumite condiţii, a tulpinilor microbiene selectate pe criteriul „productivitate în antigen

Scanned with OKEN Scanner

protector". Biomasa obţinută este apoi supusă operaţiunilor de extracţie şi purificare a antigenilor urmăriţi. Antigenii pot fi izolaţi atât din culturi vii de microbi, cât şi din culturi inactive.

În categoria vaccinurilor chimice intră şi *anatoxinele*, care sunt exotoxine bacteriene cu proprietăţi antigenice şi imunogene. Şi în acest caz se recurge la cultivarea bacteriilor care produc toxine (cum ar fi microorganismele ce produc difteria, tetanosul, botulismul, holera etc) pe medii lichide, iar prin filtrare se separă biomasa acumulată de lichidul care conţine toxinele specifice. Toxinele sunt apoi neutralizate prin diverse metode (cel mai adesea prin tratarea cu formol), fără să fie modificată structura toxinei (care reprezintă în fapt antigenul).

Deşi vaccinurile chimice sunt mai puţin valoroase ca cele vii, ele au totuşi unele avantaje, dintre care menţionăm:

- nu prezintă pericolul de a da complicaţii după vaccinare;
- pot fi folosite în realizarea de preparate asociate plurivalente (care previn sau combat mai mulţi agenţi patogeni);
- se por standardiza mai uşor;
- determină mai puţine reacţii negative, (VIESTURS et al. 1991).

Vaccinurile pot avea la bază şi *antigeni sintetizaţi artificial* prin crearea de macromolecule care posedă determinanţii antigenici specifici unor microorganisme. Capacitatea imunogenică a acestor antigeni poate fi mărită prin folosirea de adjuvanţi (compuşi sintetici micromoleculari, analogii unor compuşi produşi de microorganisme). Primul compus sintetizat, care prezintă acest efect, a fost *muramildipeptida* (MDP), analog cu cel descoperit la mycobacterii. Acţiunea lui de potenţare a răspunsului imun a fost atestată în cazul vaccinului antigripal, a vaccinului antimalarie, a vaccinului contra encefalitei cabaline venezuelene. S-a constatat că în afară de MDP, activitatea limfocitelor T poate fi stimulată şi de alţi adjuvanţi ca: lipopolizaharidele, acidul poliadeniluridilic, interferonul, adenovirusurile etc.

Vaccinurile de tip nou conţin în unele cazuri doar peptide imunogene (porţiuni din proteina virală propriu-zisă), oligopeptide care determină caracterul antigenic (*epitopul*). Ele pot fi produse prin sinteză chimică sau prin operaţiuni de inginerie genetică. Au fost sintetizate oligopeptide de acest gen pentru proteinele specifice virusurilor poliomielitei, rabiei, hepatitei B etc. Absenţa unei structuri tridimensionale specifice proteinei, face ca uneori aceste oligopeptide să

Scanned with OKEN Scanner

aibă capacitate imunogenă mai scăzută. O altă cale investigată de specialişti este cea a *anticorpilor anti-idiotipici*, pe care i-am putea numi anticorpii anticorpilor, adică acei anticorpi produşi împotriva anticorpilor specifici unui antigen dat. Ei ar avea o parte din moleculă asemănătoare cu antigenul şi ar putea fi utilizaţi în locul antigenului însuşi pentru stimularea răspunsului imun, (SASSON, 1993).

În momentul de faţă, folosind tehnicile ingineriei genetice, se pot obţine unele proteine imunogene prin manipularea genetică a bacteriilor şi drojdiilor. Astfel Societatea americană de inginerie genetică GENENTECH produce din 1994 un vaccin împotriva febrei aftoase la animale, obţinut prin transferul genelor pentru proteinele virale în bacilul colic. Un procedeu asemănător se foloseşte şi la obţinerea vaccinului contra leucemiei felinelor, boală provocată de un retrovirus (a fost clonată în bacilul colic gena pentru proteina P_{45}, care induce formarea de anticorpi specifici la pisici).

O mare provocare o reprezenta obţinerea unui vaccin împotriva hepatitei B, boală de natură virotică. Virusul hepatitei B are la exterior un înveliş constituit din trei proteine, din care una se află în cantitate mai mare (proteina majoră) şi un înveliş intern format dintr-o singură proteină. Genomul viral, constituit din ADN circular conţine doar 3200 nucleotide şi prezintă o catenă lungă (L) de 3200 nucleotide şi una scurtă (S) care reprezintă între 50% şi 100% din cea lungă, ceea ce face ca între 0 şi 50% din ADN să fie monocatenar. În 1979 s-a reuşit secvenţierea ADN-ului viral şi s-a constatat că el se constituie în 4 gene, notate cu S, C, P şi X, din care gena S codifică proteina majoră, gena C – proteina ce poartă antigenul capsidal, gena P – ADN-polimeraza, iar gena X – o proteină ce se exprimă în hepatocitele indivizilor infectaţi. Virusul acestei boli nu se poate reproduce în culturi de ţesuturi sau organisme sensibile. Pentru producerea antigenului HBs specific acestui virus se folosesc celule de eucariote (drojdii, celule de rozătoare şi primate), din considerentul că producerea lui de către bacterii ar putea fi letală pentru acestea, sau că ar putea fi distrus de enzimele bacteriene. Acest vaccin a fost obţinut prin inginerie genetică din antigenul de suprafaţă (HBsAg), produs în levuri şi în celule animale. VALENZUELA et al., au identificat în 1979 gena pentru HbsAg, (care codifică 226 aminoacizi) şi au clonat-o în bacilul colic, rezultat obţinut mai apoi şi de alţi autori. Doi ani mai târziu, RUTTER et al., reuşeşte producerea antigenului în celule de

Scanned with OKEN Scanner

drojdie de bere (celule care au capacitatea de a glicozila antigenul, aducându-l astfel într-o formă foarte asemănătoare cu cel din serul bolnavilor cronici de hepatită B). Antigenul imunogen este apoi înalt purificat de proteinele aparţinând celulelor producătoare, 1 ml de cultură de drojdie asigurând producerea a 1-3 μg antigen, o doză de vaccin fiind evaluată la 10 μg. Testarea la cimpanzeu a acestui antigen obţinut prin inginerie genetică a asigurat o protecţie bună faţă de boală. Antigenul HbsAg a fost produs de către unele companii de inginerie genetică şi pe linii celulare de mamifere, folosindu-se ca vectori adenoviruşi, virusul SV40, VPB (virusul papilloma bovin), plasmide bacteriene, iar prin amplificarea genei s-au obţinut cantităţi de 20 μg/ml de cultură în 24 de ore. Antigenul produs de către celulele animnale este superior celui sintetizat de microorganisme, deoarece este frecvent glicozilat, extracţia lui se face fără dificultăţi, iar producerea lui este continuă, (SASSON, 1993). Lucrări de acest gen se efectuează şi pentru obţinerea altor antigeni virali.

Se urmăreşte de asemenea obţinerea de vaccinuri polivalente prin folosirea tehnicii genelor fuzionate. Astfel, în 1985 VALENZUELA et al. (citaţi după SASSON, 1993) au fuzionat un segment de ADN ce specifică un fragment din glicoproteina D a virusului herpetic cu segmentul pre-S, ce specifică proteina de înveliş a virusului hepatitei, iar gena recombinant a fost introdusă în drojdii pentru exprimare. Deşi antigenitatea specifică a produsului a fost conservată, particulele hibrid obţinute nu au indus producerea de anticorpi contra celor două virusuri. O astfel de genă hibridă s-a realizat şi între gena S a virusului hepatitei B şi un fragment de ADN pentru un segment din proteina capsidei virusului poliomielitei, ea fiind introdusă în celule de mamifere pentru exprimare. S-a constatat că aceste proteine hibride induc totuşi titruri scăzute de anticorpi la animalele de laborator testate. În 1987 s-a reuşit producerea unei proteine hibride între toxina difterică şi antigenul de suprafaţă al virusului hepatitei B, care inoculată la animalele de laborator inducea sinteza anticorpilor specifici (contra toxinei difterice şi HbsAg), (SASSON, 1993).

Tehnicile de inginerie genetică sunt larg folosite de către firmele americane Biotech şi Immunex în producerea de proteine imunogene.

Scanned with OKEN Scanner

2.5. Hibridomii şi producerea de anticorpi monoclonali

Organismele animale şi umane sunt dotate cu un sistem de protecţie împotriva unor substanţe şi celule străine. Aceste substanţe sau celule pot fi microorganisme (bacterii, ciuperci, virusuri etc), celule provenite de la alt organism prin transplant, diverse proteine, enzime, hormoni, polizaharide, toxine etc, care poartă numele de *antigeni*. În bolile autoimune pot deveni antigeni chiar celule ale propriului organism sau produşii lor de metabolism. Sistemul imunitar recunoaşte aceşti antigeni şi caută să-i inactiveze şi elimine din organism prin producerea unor substanţe de apărare denumite *anticorpi* (având natură proteică - *imunoglobuline*). Aceştia au specificitatea absolută, în sensul că acţionează doar împotriva antigenilor care i-au generat. Diversitatea anticorpilor produşi de organismul uman este enormă, fiind evaluată la cca 10^7. Ei sunt produşi în organism de celule specializate - limfocitele B, aflate în sânge, splină, nodulii limfocitari. Există probabil tot atâtea clone de celule câte tipuri de anticorpi produşi de organism. Multitudinea acestor clone celulare, care acţionează simultan, face ca în organism, să existe o populaţie heterogenă de anticorpi. Anticorpii monoclonali sunt acei anticorpi produşi doar de către o clonă celulară.

Obţinerea de anticorpi prin procedeele clasice constă în imunizarea animalelor de laborator cu un anumit antigen. În serul acestor animale vor fi prezenţi însă şi alţi anticorpi decât cel dorit, fapt ce complică mult operaţiunile necesare pentru purificarea lor. În 1975, KOHLER şi MILSTEIN au descoperit o metodă de obţinere a anticorpilor omogeni, cu specificitate strict determinată - *anticorpi monoclonali.*

Începând din 1960, când BARSKI et al. de la Institutul Gustave-Roussy din Villejuif (Franţa) au descoperit posibilitatea hibridării unor linii de celule tumorale de şoarece aflate într-o cultură mixtă, s-a progresat rapid în domeniul obţinerii de hibrizi somatici între celule de proveniență diversă.

Plecând de la experienţa sa în domeniul fuziunii celulelor de mielom la şoarece şi şobolan, KOHLER s-a gândit să izoleze o clonă de celule care să producă un anumit antigen. Aceasta ar presupune în primul rând izolarea unei linii speciale de limfocite, care să producă doar un tip de anticorpi. În schimb, celulele din anumite mieloame (tumori maligne ale măduvei osoase) pot fi cultivate la infinit şi produc imunoglobuline

Scanned with OKEN Scanner

cu structură identică. De aici a pornit ideea lui KOHLER de a îmbina proprietăţile celor două tipuri de celule prin realizarea fuziunii între un mielocit şi un limfocit (provenit dintr-o populaţie expusă în prealabil la un anumit antigen). Misiunea nu era simplă şi pentru faptul că limfocitele fuzionează mai greu. În experienţele anterioare KOHLER izolase o linie de mielocite P_3 de şoarece rezistentă la azaguanină. În 1974, el a reuşit să realizeze (cu ajutorul PEG) fuziunea între celule ale acestei linii cu limfocite izolate din splina de şoarece (care în prealabil fuseseră imunizate la hematiile de oaie), obţinând celule hibride - *hibridomi*. Împreună cu MILSTEIN au izolat apoi clone de celule hibride pe care puteau să le menţină în cultura *in vitro* şi care produceau doar acest tip de anticorpi, împotriva hematiilor de oaie. Astfel, această celulă hibridă prezenta simultan ambele proprietăţi menţionate anterior: nemurirea (multiplicarea la infinit) - provenită de la mielocit şi producerea unui anticorp specific - provenită de la lifocit. A fost aceasta o mare descoperire a deceniului al 8-lea din secolul trecut, care încununa efortul a două decenii de activitate în domeniul sintezei anticorpilor, culturii şi fuziunii celulelor somatice, (SASSON, 1988).

Între timp s-au dezvoltat biotehnologii diverse pentru producerea lor pe sacră largă. Anticorpii monoclonali sunt eliberaţi în mediul de cultură şi izolaţi din acesta cel mai adesea prin precipitare cu sulfat de amoniu. În prealabil se fac însă operaţiuni de screening asupra hibridomilor ai căror anticorpi produşi dau reacţie pozitivă la antigenul specific (se izolează clonele sau hibridomii pozitivi), hibridomi care urmează a fi apoi cultivaţi. Întrucât unii hibridomi îşi pierd uneori în timp această capacitate, trebuie mereu verificată şi reluată operaţiunea de clonare a celor care produc anticorpi. Ei pot fi de asemenea obţinuţi *in vitro*, în organismele animale (şoarece sau şobolan). În acest caz ei sunt inoculaţi subcutanat, intraclavicular sau intraventral la animalele de experienţă, unde într-un interval de 10-14 zle produc tumori. Se recoltează apoi serul sau lichidul ascitic, în care se concentrează anticorpii monoclonali produşi, de unde sunt separaţi prin diverse proceduri.

De ce au stârnit anticorpii monoclonali atâta interes? Se consideră că principalele domenii de utilizare a lor sunt următoarele:

- diagnosticarea bolilor cu etiologie diversă (infecţioase, ereditare, autoimune, alergice etc.);

Scanned with OKEN Scanner

- perfecţionarea vaccinurilor;
- studierea epidemiologiei bolilor;
- studii de patogeneză şi imunologie;
- cunoaşterea mecanismelor de diferenţiere a celulelor şi ţesuturilor (prin recunoaşterea de către anticorpi a moleculelor de la suprafaţa celulelor);
- terapia unor boli infecţioase şi a cancerului;
- evidenţierea compoziţiei antigenice (determinanţilor antigenici) a diverselor grupe de microorganisme;
- dezvoltarea imunologiei;
- dozarea concentraţiei hormonilor din organism şi aprecierea funcţiei unor glande endocrine;
- determinarea prezenţei şi concentraţiei unor substanţe interzise, a medicamentelor din organism etc, (VIESTURS et al., 1991; SASSON, 1993).

Cu ajutorul anticorpilor monoclonali se poate estima doza optimă a unui medicament ce trebuie administrat, se poate purifica o substanţă cu rol biologic (proteină, hormon, toxină) aflate în amestec. Ei asigură o mai bună localizare a mediatorilor chimici din organism, posibilitatea preparării unor vaccinuri foarte specifice (împotriva unei anumite tulpini virale, de exemplu). Se consideră de asemenea că ei ar putea fi folosiţi în neutralizarea limfocitelor implicate în respingerea grefelor, sau a anticorpilor care apar în bolile autoimune. Asocierea lor cu medicamentele ar putea contribui la creşterea eficienţei acestora asupra celulelor ţintă (de exemplu, în terapia cancerului), diminuând astfel efectele secundare ale unor medicamente etc. Au fost deja produşi anticorpi monoclonali pentru diagnosticul unor forme de cancer: de stomac, intestin, colon, pancreas, prostată, carcinom hepatic etc. S-au elaborat totodată metode de tratament al cancerului cu ajutorul anticorpilor monoclonali.

2.6. Ingineria genetică şi implicaţiile ei în medicină. Tehnologia ADN-recombinant

Succesele remarcabile înregistrate în genetică în deceniile 6-7 ale secolului trecut au permis omenirii să spere că, mai devreme sau mai târziu, multe din problemele cu care se confruntă în agricultură, sănătate, protecţia mediului, obţinerea de energie din surse neconvenţionale etc,

Scanned with OKEN Scanner

vor putea fi rezolvate. Cea mai mare provocare, dar şi îngrijorare, a constituit-o descoperirea (în anii 1970 ai secolului XX) a posibilității de a sintetiza, de a izola genele şi de a le transfera de la un organism la altul, de a obține organisme transgenice, cu însuşiri noi. Deşi riscurile folosirii necontrolate a unor astfel de tehnici şi tehnologii nu au fost şi nu sunt de neglijat, marile lor promisiuni, şi de acum realizări, ne fac să privim cu optimism viitorul, inclusiv sub aspectul terapiei genice a unor boli ereditare, sau a unor boli grave (cum e cancerul) la om.

În acțiunea de transgeneză la pro- şi eucariote s-au identificat între timp diverse posibilități. Oricare ar fi aceastea, trebuie să se plece de la izolarea unei anumite gene (care urmează a fi transferată) şi de la identificarea unui vehicul pentru transferul şi clonarea ei.

Tehnologia ADN-recombinant presupune izolarea sau sinteza artificială a unei gene, clonarea şi transferul ei prin intermediul unui vector într-o celulă receptoare. Clonele reprezintă celule sau molecule identice care derivă dintr-o singură celulă, respectiv moleculă. Clonarea ADN-ului se bazează pe capacitatea pe care o au unele plasmide şi fagi de a încorpora material genetic străin în genomul lor, păstrând capacitatea de a se reproduce. Se obțin plasmide sau fagi hibrizi (chimere) care, pe lângă genomul propriu conțin şi gene străine (LEVIN, 1997), un ADN-recombinant. Prima dată a fost obținut un astfel de ADN de către BERG şi era reprezentat de un hibrid ADN între fagul lambda şi genomul virusului SV40, reuşită pentru care autorul a primit în 1980 premiul Nobel în chimie.

Tehnologia ADN-recombinant pleacă cel mai adesea de la ARN-mesager specific pentru o anumită proteină, care este extras din țesutul în care această proteină este bine reprezentată. Prin intervenția cu reverstranscriptază se sintetizează apoi un ADN monocatenar (complementar, un ADNc), care este adus în stare dublucatenară cu ajutorul ADN-polimerazei. Gena astfel obținută (sau sintetizată chimică), poartă numele de pasager şi este inserată cu ajutorul enzimelor de restricție şi ADN-ligazelor într-un vector (plasmide, virusuri etc) - care poartă numele de vector de clonare, iar vectorul o va transfera într-o bacterie prin transformare genetică. Bacteriile transformate genetic pot fi multiplicate la infinit pentru obținerea cantității dorite de ADN-recombinant sau produsului specific al genei transferate, (fig. 2.21). Un

Scanned with OKEN Scanner

rol important în dezvoltarea acestei tehnologii l-au avut descoperirea enzimelor de restricție și identificarea vectorilor de clonare.

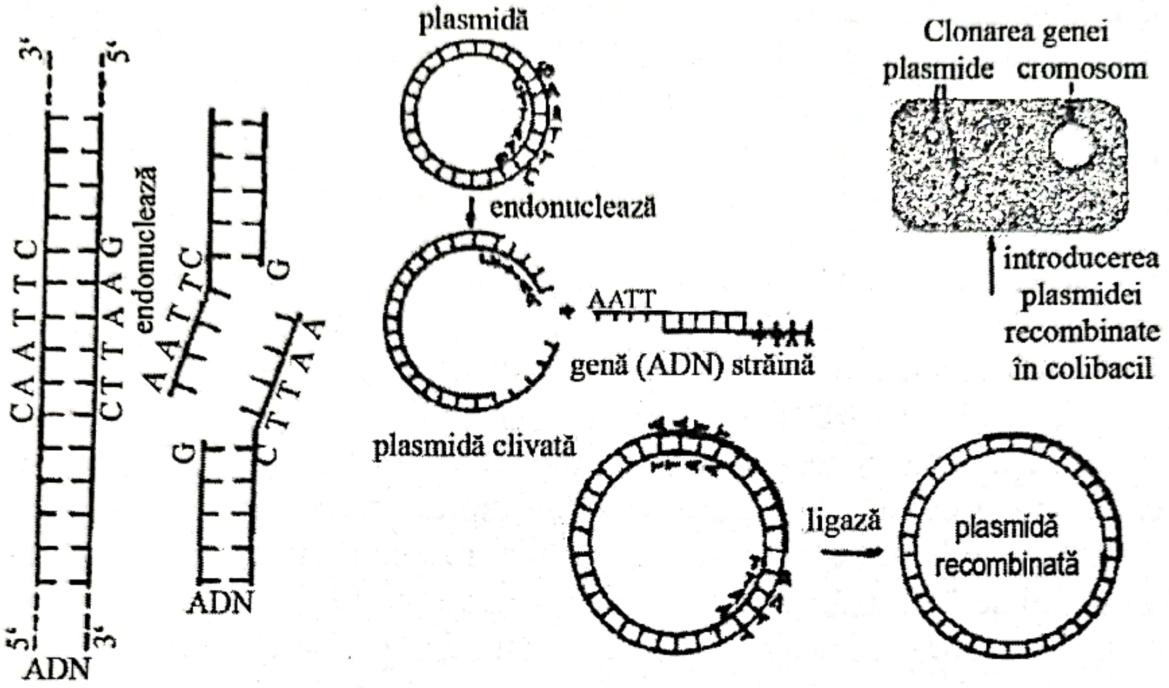


Fig. 2.21. Schemă privind inserția în plasmidă a unei gene și clonarea ei la bacilul colic (după SASSON, 1988)

2.6.1. Enzimele de restricție și de modificare

Existența enzimelor de restricție a fost evidențiată în 1970. Enzimele de restricție sau restrictazele reprezintă un fel de „bisturie moleculare", care au capacitatea de a secționa moleculele de ADN în locuri (situsuri) specifice. Ele asigură protecția bacteriilor împotriva fagilor. Aceste enzime provoacă hidroliza a două legături fosfodiesterice, câte una pe fiecare catenă a ADN-ului. Restrictaza Eco RI (de la *Escherichia coli*), de exemplu, recunoaște secvența: 5'- GAATTC – 3' (3' – CTTAAG – 5'), care reprezintă un palindrom (aceleași secvențe de nucleotide pe ambele catene, dar cu orientare inversă). Ele fac parte dintr-un sistem enzimatic – de *restricție și modificare*, format dintr-o enzimă de restricție și una de modificare. Enzima de modificare „recunoaște" și „modifică", printr-o reacție specifică, aceeași secvență de nucleotide din ADN ca și restrictaza corespunzătoare. Modificarea reprezintă mecanismul de protecție a ADN-ului propriu de la degradare, iar enzimele de restricție împiedică încorporarea de ADN străin în

Scanned with OKEN Scanner

genomul bacteriilor şi perturbarea echilibrului lor funcţional. Protecţia ADN-ului faţă de restrictaze se realizează prin reacţii de metilare (cel mai adesea) sau glicolizare. Metilarea, produsă prin acţiunea metilazelor, are loc de regulă pe ambele catene ale ADN-ului, deşi este suficientă modificarea unei singure catene ADN pentru a preveni intervenţia restrictazelor. Enzimele de modificare asigură supravieţuirea bacteriilor în asociaţii bacteriene heterogene şi în medii naturale foarte variate.

Există un număr foarte mare de endonucleaze de restricţie (câteva sute), a căror nume provine de la bacteria unde au fost identificate şi izolate. Astfel, Eco Ri - provine de la *Escherichia coli* (tulpina RY13), Bam Hi - de la *Bacillus amyloliquefaciens* (tulpina H), Hin dII - de la *Haemophilus influenzae* (tulpina Rd), Bgl I - de la *Bacillus globigii* etc. Numeroase restrictaze secţionează ADN-ul în locuri specifice şi formează extremităţi monocatenare adezive la vector, la care aderă catenele ADN ale genei pasager.

2.6.2. Vectori folosiţi în transferul genelor

Genele străine (pasager) nu pot fi integrate direct în cromosomul bacteriei receptoare, iar pentru replicare ele trebuie să fie încorporate într-o structură care se poate replica autonom. Această structură este reprezentată de vector sau vehiculul de clonare. El reprezintă un intermediar între gena care urmează să fie clonată şi celula receptoare. Pentru a îndeplini această misiune, vectorul trebuie să întrunească o serie de condiţii, printre care enumerăm:

- să fie de dimensiuni mici şi să nu posede informaţie genetică esenţială;
- să se replice autonom şi să fie tolerat de celula gazdă;
- să aibă în structura lui doar un situs de recunoaştere pentru restrictaza folosită (pentru ca gena străină încorporată în el să nu-i perturbe funcţiile);
- să fie uşor de izolat şi sensibil la aceleaşi restrictaze ca şi gena pasager ce va fi integrată în el;
- să determine manifestarea de către celula gazdă a unor însuşiri ce por fi uşor de evidenţiat (cum ar fi: rezistenţă la unele antibiotice, auxotrofie, plaje de liză specifice etc), care să faciliteze acţiunea de izolare a celulelor trasformate genetic etc.

Scanned with OKEN Scanner

Vectorii cei mai utilizaţi în transferul de gene străine la microorganisme sunt plasmidele. Ele au o greutate moleculară de 2-2 x 10^6 daltoni. Prima plasmidă vector, *pSC-101*, a fost izolată în 1973 de către COHEN din factorul de rezistenţă la bacilul colic şi prezenta o genă marker pentru rezistenţă la tetraciclină. Între timp au fost obţinute plasmide vector şi pentru alte microorganisme decât *Escherichia coli*, cum ar fi: *Bacillus subtilis, Seratia marcescens, Pseudomonas sp, Streptomyces sp.* S-au realizat şi vectori navetă, adică plasmide care asigură transferul de ADN străin la 2 specii diferite, cum e cazul plasmidei *pSC 101-Col* E_1, care se poate clona fie în *Escherichia coli* şi *Bacillus subtilis*, fie în *Escherichia coli* şi *Saccharomyces cerevisiae.* Alte plasmide cunoscute şi utilizate în acţiunea de transgeneză la microorganisme sunt *pBR 322* (care prezintă gene marker pentru tetraciclină şi ampicilină), *pUC* (care posedă gena pentru glucuronidază şi determină colorarea în albastru a celulelor) etc.

La plante sunt folosite ca vectori plasmidele *Ti* de la *Agrobacterium tumefaciens* (care provoacă tumorile *crown-gall* în zona coletului unor dicotiledonate) şi *Ri* de la *A. rhizogenes* (care produc un tip special de rădăcini - *hairy roots*), dar şi unii viruşi (adenoviruşi). Pentru transferul genelor la plante se mai utilizează ca metode: *microinjectarea, electroporaţia, endocitoza, bombardarea cu microparticule* încărcate cu ADN, *polietilenglicolul, lipozomii, transpozonii* etc, unele dintre acestea fiind folosite şi la animale.

Cea mai simplă metodă de transgeneză la animale este injectarea în celula ou (imediat după fecundare) a unei soluţii în care se găsesc copii numeroase ale genei străine. Materialul genetic trebuie injectat în nucleu, iar în cazul injectării în citoplasmă se asociază cu polilizina pentru a-l feri de degradare enzimatică. În transgeneză la animale se folosesc şi unii vectori virali cum ar fi: vehicule derivate din mutanţi ai fagului lambda (denumite fagi Charon), mutanţi ai virusului de maimuţă SV40, ai virusului papilloma bovin (BPV), unele retrovirusuri, ca şi vectori rezultaţi din combinarea între fagi şi plasmide (*cosmide*) etc.

Pentru transferul de gene la om, specialiştii s-au orientat şi către virusul herpetic (care infectează celulele nervoase şi care ar putea fi utilizat în tratamentul unor boli ca parkinsonismul, boala Alzheimer etc), către parovirusuri (virusul uman adeno-asociat, virusul H etc), către unii adenoviruşi umani etc.

Scanned with OKEN Scanner

2.6.3. Utilizarea tehnologiei ADN-recombinant în producerea unor substanţe de interes medical

Pentru utilizarea tehnologiei ADN-recombinant, după 1976 s-au înregistrat numeroase succese în care bacilul colic a fost determinat să producă diverse proteine şi hormoni ca: somatostatina, somatotropina de şobolan şi om, insulina de şobolan şi om, ovalbumina din albuşul de ou, interferonii, hemaglutinina virusului gripal, factorii plasmatici VIII şi IX implicaţi în hemofilie, antigenii virusului hepatitei B etc.

Producerea somatostatinei

Somatostatina umană controlează activitatea hormonului de creştere şi este un hormon constituit din 14 aminoacizi. În 1977 ITAKURA şi colaboratorii săi au sintetizat un ADN format din 52 de nucleotide, din care 42 serveau la codificarea celor 14 aminoacizi ai hormonului, iar restul de 10 asigurau integrarea genei în plasmida pBR 322, pentru a fi apoi transferată în bacilul colic. Gena a fost inserată în plasmidă în apropierea operonului „lac" şi pusă sub controlul acestuia. Plasmida pBR 322 a fost supusă succesiv la mai multe operaţii, realizate cu ajutorul restrictazelor Eco Ri şi Bam I care au modelat-o în aşa fel încât gena pasager să fie inserată la capătul terminal al genei pentru β-galactozidază, care-i permitea să se exprime. Bacteriile transformate genetic produceau o proteină hibridă: hormon + enzimă (β-galactozidaza), care erau apoi separate pe cale chimică. Transformanţii erau recunoscuţi pe baza rezistenţei la ampicilină şi culoarea albastră a coloniilor (datorată producerii de β-galactozidază).

Acestă tehnologie a fost preluată de Societatea Genentech (fondată în 1976 la San Francisco-SUA), care în 1977 anunţa producerea de somatostatină cu un randament de 10.000 molecule/celulă bacteriană, ceea ce însemna că într-un fermentator de 8 litri se obţineau 5 mg hormon dintr-o cantitate de 100 g celule bacteriene. Pe căi tradiţionale aceeaşi cantitate se obţinea prin prelucrarea a *cca* 100 tone creier de oaie, (SASSON, 1988).

Producerea insulinei

Insulina umană este o proteină formată din două catene polipeptidice, care conţin 109 aminoacizi. Şi în acest caz, la început s-a mers pe sinteza genelor corespunzătoare celor două catene polipeptidice ale insulinei. CREA et al. (1979) au inclus aceste gene într-o plasmidă către extremitatea genei pentru β-galactozidază. Insulina era produsă cu

Scanned with OKEN Scanner

un randament de *cca* 100 mii de molecule/bacterie. Şi în acest caz se obţinea un hibrid între lanţurile polipeptidice şi enzimă, care erau separate, iar catenele specifice insulinei erau asociate pe cale chimică.

Un an mai târziu, GILBERT si VILLA-KOMAROFF izolau ARNm pentru insulină dintr-o tumoare a celulelor β din pancreasul de şobolan, cu ajutorul reverstranscriptazei sintetizau un ADNc corespunzător, pe care apoi îl inserau în plasmida pBR 322 a bacilului colic, în mijlocul genei pentru penicilinază. Şi în acest caz se producea o proteină hibrid (proinsulină + penicilinază), care erau separate cu ajutorul tripsinei. În 1982 firma Ely Lilly din SUA era autorizată să producă şi comercializeze insulină umană (*Humulin*) obţinută prin această tehnologie.

Producerea somatotropinei

Hormonul de creştere uman (somatotropina) este secretat de hipofiză şi insuficienţa lui provoacă tulburări de creştere (nanism hipofizar). Prin metode clasice, hormonul se obţine din hipofize recoltate de la cadavre, dintr-o hipofiză extregându-se cca 4-6 mg hormon.

Somatotropina are în moleculă 191 de aminoacizi. În 1979 GOEDDEL et al. au urmat protocolul deja cunoscut, plecând de la ARNm specific hormonului, au obţinut ADNc corespunzător şi au reuşit un randament de producere a somatotropinei în bacilul colic de cca 2,4 µg/ml mediu de cultură. Hormonul avea un rest de metionină, care nu-i afecta activitatea fiziologică. Teste efectuate pe un lot de copii cu nanism hipofizar la San Francisco arătau că hormonul obţinut prin manipulare genetică inducea un spor anual de creştere asemănător cu lotul de control (tratat cu hormon extras din hipofiză). Firma suedeză Kabi Vitrum AB a preluat această tehnologie pentru producerea de somatotropină.

Producerea interferonilor

Într-un capitol anterior am discutat importanţa interferonilor pentru sănătate şi metodele clasice de obţinere a lor. Aceste metode (care folosesc fie infectarea cu virusul Sendai a leucocitelor umane rezultate din prelucrarea sângelui de la donatori, fie a culturilor de celule din splină) produc interferoni la un preţ ridicat, cu randament scăzut şi puritate insuficientă.

În 1980, WEISMANN şi colaboratorii săi au izolat ARNm specific interferonului din culturi de leucocite umane infectate cu virusul Sendai, pe care l-au folosit în obţinerea ADNc, după care l-au convertit în ADN

Scanned with OKEN Scanner

dublucatenar şi i-au eliminat porţiunile monocatenare cu ajutorul unei endonucleaze. Vehiculul de clonare a fost plasmida pBR 322, iar gazda - celulele bacilului colic. Bacteriile transformate genetic produceau cantităţi foarte mici (1-2 molecule/celulă) de interferon leucocitar. Folosind un procedeu asemănător, TANIGUCHI et al. obţineau în acelaşi an interferon fibroblastic (randamentul fiind ceva mai bun, cca 100 molecule/celulă bacteriană). Un an mai târziu, GOEDDEL et al. izolau ARNm specific interferonului gamma din leucocitele umane şi realizau clonarea lui în mai multe gazde: bacilul colic, drojdia de bere şi celule de maimuţă cultivate *in vitro*. Interferonul gamma era produs cu un randament de 25 mii unităţi în bacilul colic, de 100 mii unităţi în celulele de maimuţă şi de 1 milion unităţi în celulele de drojdie.

2.7. Utilizarea culturilor de celule vegetale în suspensie pentru producerea substanţelor cu uz farmaceutic

Dezvoltarea tehnicilor de cultivare a ţesuturilor şi celulelor vegetale în deceniile 7-8 ale secolului trecut au indus ideea utilizării acestora în producerea de principii active de interes farmaceutic în sisteme de cultură submerse, după modelul cultivării industriale a microorganismelor. Pentru cultivarea pe medii lichide, în condiţii aseptice, a celulelor vegetale este necesară obţinerea calusului. Calusul reprezintă o masă de celule nediferenţiate, obţinute pe medii nutritive cu o anumită compoziţie hormonală (auxine, sau citokinine + auxine), capabile să se multiplice un timp mai mult sau mai puţin îndelungat. În cazul de faţă, calusul se obţine din explante provenite de la plante producătoare de principii active. Pentru inducerea calusului se pleacă de la fragmente din diverse organe (cel mai frecvent din frunză şi tulpină) prelevate de la plante tinere şi sănătoase. În funcţie de formula hormonală utilizată se poate obţine ţesut calusal de consistenţă, culoare, viteză de proliferare şi capacitate biosintetică diferite. În general, ţesutul calusal este destul de heterogen în privinţa particularităţilor morfo-fiziologice şi biochimice, heterogenitate care derivă din: genotipul şi tipul de ţesut utilizat în generarea lui, compoziţia mediului nutritiv, condiţiile de cultivare şi subcultivare etc. Pentru realizarea de culturi de celule în suspensie, calusul trebuie să fie friabil (dar nu moale) şi să aibă capacitatea de a sintetiza o substanţă utilă. Mediul de iniţiere a culturii de calus este unul solid.

Scanned with OKEN Scanner

Obținerea inoculului de calus pentru cultura în suspensie este o operațiune extrem de importantă. În acest sens se prelevează o cantitate din calusul obținut pe medii solide (agarizate) şi se cultivă pe medii lichide timp de *cca* 3 săptămâni, în vase plasate pe un agitator. Inoculul trebuie să fie constituit din celule libere (neagregate), condiție care asigură nutriția, creşterea şi multiplicarea lor normală. E necesară de asemenea diminuarea heterogenității celulelor în suspensie, în sensul sincronizării fazelor lor de diviziune, proces asigurat prin tratamentul lor cu o serie de substanțe (5-aminouracil, hidroxiluree, fluordezoxiuridină etc). Totodată, trebuie să existe un anumit raport între mărimea inoculului şi cantitatea de mediu pentru a asigura o densitate optimă a celulelor după inoculare, apreciată la cca 0,5 - 2,5 x 10^5 celule/ml^{-1}. Modalitățile de cultivare a suspensiilor celulare pot fi de două tipuri:

a) în *sistem închis* – situație în care nu se intervine pe parcursul procesului, volumul de mediu nutritiv este fix, iar creşterea şi multiplicarea celulelor încetează odată cu epuizarea mediului în nutrienți;

b) în *sistem deschis* – caz în care se intervine în proces prin scoaterea la anumite intervale de timp a unei cantități de mediu+celule din bioreactor şi introducerea unei cantități echivalente de mediu proaspăt. Sistemul deschis permite reglarea creşterii şi multiplicării celulelor, a metabolismului celular şi a nivelului de sinteză a unor metaboliți secundari, (CACHIȚĂ - COSMA et al., 2004).

Bioreactoarele în care se realizează culturile de celule în suspensie trebuie să întrunească o serie de condiții, ca:

- să asigure sterilitatea mediului de reacție pe toată perioada de cultivare;
- să permită (prin modul de construcție) reglarea condițiilor de cultură (pH, temperatură, oxigen, dioxid de carbon etc);
- să fie prevăzute cu dispozitive de mixare a culturii;
- să permită intervenția pe parcursul procesului de fermentație pentru prelevarea de probe, aerarea culturii etc.

Primul bioreactor folosit pentru culturi de celule vegetale în suspensie a fost imaginat de TULECKE şi NICKEL în 1959, era de tip închis, avea o capacitate de 20 de litri şi reprezenta de fapt un balon din sticlă închis cu un dop din cauciuc prin care traversau 4 tuburi şi care

Scanned with OKEN Scanner

serveau la introducerea mediului nutritiv, inocularea mediului şi recoltarea probelor, admisia aerului şi respectiv evacuarea aerului şi gazelor rezultate din respiraţie (fig. 2.22). Ulterior capacitatea fermentatoarelor de producţie a crescut, ele fiind construite din oţel inoxidabil. În funcţie de modalitatea de mixare a culturii, principalele tipuri de bioreactoare utilizate în culturile de celule vegetale în suspensie sunt următoarele:

a) tancuri cu agitare (stirred tanks), care asigură mixarea culturii cu ajutorul unui rotor cu palete (având o viteză de rotaţie de 50 - 100 rpm) şi a aerului steril introdus sub presiune;

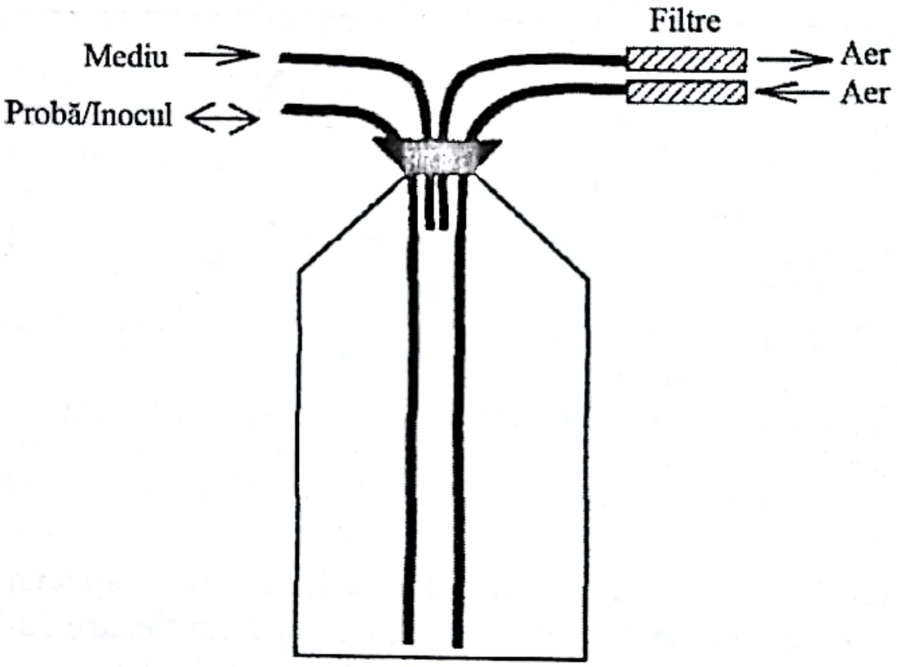


Fig. 2.22. Schema primului tip de bioreactor utilizat de către *Tulecke* şi *Nickel* în 1959 pentru creşterea *in vitro* a celulelor vegetale

b) tancuri cu bule sau cu liftare de aer (buble-tanks, air-lift), în care mixarea culturii se realizează prin barbotare cu aer steril sub presiune;

c) bioreactoare cu rotire pe orizontală (rotating drum), la care agitarea (mixarea) culturii se asigură prin rotirea pe orizontală a vasului de cultură (tuburile de acces şi de evacuare din vas fiind dispuse lateral), (fig. 2.23).

Scanned with OKEN Scanner

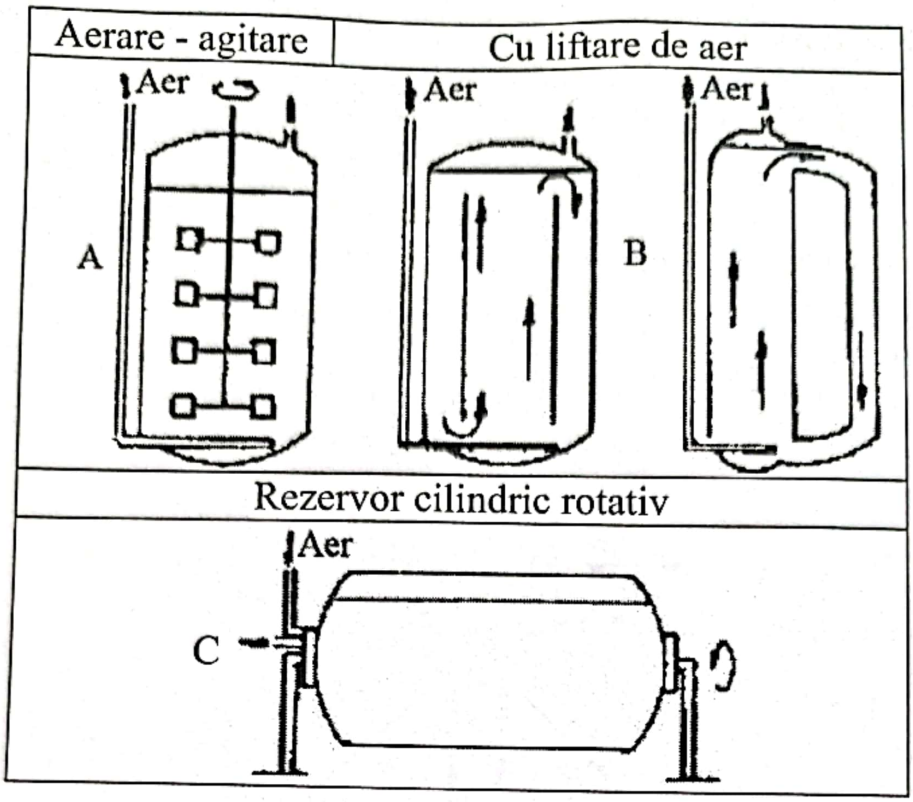


Fig. 2.23. Tipuri de bioreactoare în care mixarea/aerarea culturilor celulare este asigurată de:
A – un rotor cu palete şi prin aerare (stirred - tanks); B – prin liftarea aerului (air-lift);
C – prin rotirea vasului de cultură şi aerare de tip cilindric (rotating drum),
(după KREIS şi REINHARD, 1989)

Ciclul de cultivare a celulelor durează, funcţie de specie, 10-28 de zile, după care are loc operaţiunea de reinoculare. La fiecare 24-72 de ore se dublează numărul de celule. În condiţiile unui nivel crescut în dioxid de carbon, celulele se multiplică mai rapid. Ca şi în cazul microorganismelor cultivate pe medii lichide şi în acest caz s-au elaborat tehnologii de cultivare automatizate, care asigură controlul tuturor parametrilor (intervenţia pe parcursul procesului de "fermentaţie"), de care depinde multiplicarea optimă a celulelor şi biosinteza activă a principiilor active urmărite, (conţinutul în nutrienţi ai mediului de cultură, pH-ul, lumina, oxigenul, dioxidul de carbon etc).

Un aspect extrem de important în acest gen de culturi este selecţia unor linii celulare stabile genetic şi cu capacitate biosintetică ridicată în anumite principii active. Misiunea nu este deloc uşoară, deoarece celulele nediferenţiate cultivate *in vitro* fie că nu sintetizează principiile active specifice unei plante întregi, fie le produc în cantităţi mici, fie că

Scanned with OKEN Scanner

sintetizează alte substanţe decât cele urmărite. Astfel, dintr-un număr de 458 de clone studiate la *Catharanthus roseus,* 146 nu produceau alcaloizi, celelalte având o capacitate de sinteză a acestora cuprinsă între 0,1 şi 1,5 % din substanţa uscată. Unii dintre alcaloizii sintetizaţi în culturile *in vitro* nu fuseseră semnalaţi în planta iniţială. Desigur că toate celulele unei plante ce produce un compus farmaceutic posedă aceeaşi informaţie genetică, numai că la unele dintre ele aceasta este parţial sau total represată. Prezenţa inductorului specific este probabil legată de un anumit angrenaj metabolic, care se realizează într-o anumită etapă a creşterii şi dezvoltării plantei şi care depinde totodată de condiţiile de mediu oferite. Aşa se explică poate faptul că un calus cu capacitate biosintetică produce substanţele specifice în cantităţi diferite, funcţie de originea lui, (OHTA şi YATAZAWA, 1979). Capacitatea de biosinteză depinde şi de regulatorii de creştere folosiţi şi de concentraţia acestora în mediul de cultură (IKUTA şi ITOKAWA, 1982; OHLSON şi BJORK, 1988; PETRI, 1986), de compoziţia mediului nutritiv în substanţe organice şi minerale (CHANDLER şi DODDS, 1979; YAMADA, 1987), de vârsta culturii (CHUNG şi STABA, 1987; KARTNIG et al. 1976) etc. S-a constatat, de exemplu, că scoaterea din mediul nutritiv a 2,4-D a asigurat o intensificare de 5 ori a sintezei de *ajmalicină* în culturile de celule în suspensie la *C. roseus*, diminuarea concentraţiei de fosfat în culturile de *Nicotina tabacum* a determinat o creştere a productivităţii lor în *cinamoil-putresceine* de 3 ori, mărirea cantităţii de zaharoză în culturile de *Eschscholtzia californica* a asigurat o productivitate a celulelor de 10 ori mai mare în *benzofenantridine*, suplimentarea mediului nutritiv cu $CaSO_4$ în culturile în suspensie de *Peganum harmala* a sporit producţia de *alcaloizi β-carbolinici* de 8 ori etc, (BERLIN, 1988). În tabelul 2.2 prezentăm (după SASSON, 1988) capacitatea de biosinteză a unor principii active în culturi de ţesuturi şi celule la unele plante medicinale.

Pentru izolarea unor linii celulare vegetale mai productive se speculează fenomenul natural de mutaţie care apare în cultura *in vitro*, sau se apelează la tratamentul cu agenţi mutageni fizici şi chimici pentru inducerea artificială a mutaţiilor. Având în vedere numărul de celule care pot fi tratate în acest sistem de cultivare şi posibilitatea izolării mai rapide a unei linii celulare mai productive, prin includerea în mediul de cultură a unor factori selectivi, această metodă se poate dovedi eficientă.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2.2. Compuşi identificaţi în culturile *in vitro* la unele plante medicinale

Specia	Compuşi identificaţi
Ammi visnaga	Visnagină
Atropa belladona	Atropină, hiosciamină
Camptotheca acuminata	Camptotecină
Cassia tora	Antrachinonă
Catharanthus roseus	Ajmalină, serpentină şi alţi alcaloizi indolici
Caphalotaxus harringtonia	Cefalotoxină, harringtonină
Coffea arabica	Stigmasterol, campesterol, sitosterol, cafeină, teobromină
Coleus blumei	Acid rozmarinic
Coptis japonica	Berberină, palmitină, coptizină, jatrorrizină, magnoflorină
Datura stramonium, D. innoxia	Hiosciamină, scopolamină şi alţi alcaloizi tropanici
Digitalis purpurea, D. lanata	Antrachinone; stigmasterol, colesterol, sitosterol şi alţi steroizi, heterozide cardiotonice
Dioscorea deltoidea	Saponine steroidice (diosgenină)
Ephedra foliata (sau *gerardiana*)	Efedrină
Hyoscyamus niger	Hiosciamină, scopolamină şi alţi alcaloizi
Lithospermum erythrorhizon	Şikonină şi alţi pigmenţi
Macleaya microcarpa	Protopină, alocriptină
Matricaria chamomilla	Uleiuri volatile
Morinda citrifolia	Antrachinone, morindină
Nicotiana tabacum	Nicotină şi alţi alcaloizi; ubichinona-10 şi alte chinone (plastochinonă, tocoferol, vitamina K); compuşi fenolici (scopoletină); steroli (stigmasterol, sitosterol, campesterol, colesterol), diosgenină
Panax ginseng	Ginsenozide
Papaper bracteatum	Tebainăşi alţi alcaloizi
Papaver somniferum	Codeină, morfină, tebainăşi, papaverină, narcotină, narceină, protopină, sangvinarină şi alţi alcaloizi
Rauwolfia serpentina	Rezerpină, rescinamină
Ruta graveolens	Alcaloizi, rutacridonă; compuşi fenolici (bergapten, psoralen), uleiuri volatile, pigmenţi

Scanned with OKEN Scanner

Prin cicluri repetate de mutație-selecție se asigură ameliorarea continuă a însușirilor de producție ale liniilor celulare.

Suspensiile celulare vegetale produc metaboliți secundari după mai multe modele:

- sinteza și acumularea acestora are loc paralel cu creșterea și multiplicarea activă a celulelor. Este cazul sintezei unor metaboliți ca: *nicotina, alcaloizii tropanici, antrachinonele* de tip *morindin*;
- sinteza acestor metaboliți se produce în faza de declin sau de încetare a creșterii. Un exemplu îl reprezintă sinteza *polifenolilor*;
- curba de sinteză este diafazică, creșterea celulelor precedând sinteza metaboliților secundari, așa cum e cazul sintezei de *diosgenină,* (CROCOMO et al., 1981).

Cel mai adesea acumularea metaboliților secundari în culturile în suspensie se produce în momentul când celulele intră în faza staționară de creștere, (KURZ, 1986).

Importanța deosebită a unora din alcaloizii indolici de la specia *Catharanthus roseus* în terapia unor forme de cancer, în special *vinblastina* și *vincristina*, a determinat un efort susținut de cercetare pentru sinteza lor în culturi de celule în suspensie. Deși au fost izolate și cercetate mii de linii celulare numai în Laboratorul de la Saskatoon (SUA), nu s-au obținut succese notabile, (KURZ, 1986). De altfel, aceste succese sunt limitate, după cum rezultă din tabelul alăturat (tabelul 2.3).

Cel mai spectaculos rezultat a fost furnizat de cultivarea celulelor speciei *Lithospermum erythrorhizon*, care sintetizează pigmentul *shiconină*. S-au izolat linii celulare cu capacitate biosintetică net superioară plantelor întregi: de la 1,7% din biomasa uscată în planta întreagă - la 15,3% în culturi de celule în suspensie într-o primă fază și mai apoi la 23,2%. Rezultate promițătoare s-au mai obținut prin screening repetat la *Coptis japonica* în sinteza de *berberină* (de la 5% la 8,2%), la *Nicotina tabacum* (de la 0,7% *nicotină* și 0,05% *ubiquinonă* - la 2,5% și respectiv 0,5%) etc, (BERLIN, 1988).

Succesele înregistrate în domeniul culturilor de celule vegetale în suspensie sunt limitate, departe de cele scontate, dovadă că omul, în ciuda inventivității sale, mai are multe de învățat de la natură.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2.3. Conținutul unor substanțe biologic active în planta intactă și în cultura de celule în suspensie (după VIESTURS et al., 1991)

Substanța (produs integral)	Planta	Conținutul produsului integral, % din substanța uscată	
		culturi celule	plantă intactă
Ajmalicină	*Catharanthus roseus*	1,0	0,3
Antrachinonă	*Morinda citrifolia*	18,0	2,2
Visnagină	*Ammi visnaga*	0,31	0,1
Ginsengozidă	*Panax ginseng*	27,0	4,5
Glutation	*Nicotiana tabacum*	1,0	0,1
Diosgenină	*Dioscorea deltoidea*	2,0	2,0
Cofeină	*Coffea arabica*	1,6	1,6
Acid rozmarinic	*Coleus blumei*	15,0	3,0
Serpentină	*Catharanthus roseus*	0,8	0,5
Ubichinonă – 10	*Nicotiana tabacum*	0,036	0,003
Șiconină	*Lithospermum erythrouhizon*	12,0	1,5

Trebuie depășite o serie dificultăți, printre care menționăm:

- viteza redusă de creștere a celulelor vegetale;
- instabilitatea genetică a liniilor producătoare;
- productivitatea relativ scăzută în metaboliții secundari sintetizați;
- frecvența ridicată a infecțiilor, (VIESTURS et al., 1991).

Așa cum arătam la un moment dat, sinteza unor metaboliți secundari depinde de gradul de organizare și diferențiere a celulelor vegetale, de prezența unor structuri specifice. Sinteza uleiurilor eterice este legată, de exemplu, de prezența perilor glandulari și a canalelor secretoare, latexul se formează după structurarea vaselor laticifere, prezența alcaloizilor tropanici este asociată cu formarea rădăcinilor etc, (CROCOMO, 1981). Cea mai rentabilă sursă de principii active în cultura *in vitro* este cultura de organe, în special de rădăcini. Pe mediile de cultură aprovizionate cu precursori și elicitori adecvați, în condiții optime de temperatură și lumină, s-au realizat sporuri semnificative ale conținutului unor metaboliți secundari în culturile în suspensie. În culturile unor plante medicinale infectate cu *Agrobacterium rhizogenes*, pe lângă proliferarea masivă a rădăcinilor *(hairy roots)*, s-a stimulat evident și capacitatea de biosinteză a metaboliților secundari specifici. Exemplele de acest gen sunt numeroase. Rădăcinile transformate de *Atropa belladonna* au produs cantități echivalente cu cele furnizate de rădăcinile plantelor intacte.

Scanned with OKEN Scanner

Perfecţionarea tehnicilor de transgeneză la plante, în ciuda numeroaselor rezerve şi proteste venite din cele mai diverse medii sociale, vor asigura depăşirea dificultăţilor actuale. Ele vor permite în mod cert izolarea unor linii celulare înalt producătoare şi cu capacitate proliferativă ridicată, condiţii esenţiale pentru mutarea culturilor unor plante medicinale din câmp în laborator şi apoi în hala industrială.

Pentru studiul metabolismului şi producerea unor principii active în culturi de celule în suspensie, ca şi pentru biotransformarea unor precursori în anumite principii active, s-au dezvoltat tehnici de imobilizare a celulelor vegetale (prin adsorbţie la un substrat solid; prin includere în diverse geluri, fibre, capsule, inserţie între membrane sintetice; prin floculare şi agregare). Prima reuşită de imobilizare a fost raportată în 1979, aparţine lui BRODELIUS şi colaboratorilor săi, care au imobilizat celule de *Digitalis lanata*, *Catharanthus roseus* şi *Morinda citrifolia* în geluri de alginat. În urma imobilizării celulelor, randamentul de producţie creşte evident. Avantajele sistemului sunt certe: menţinerea activă şi stabilă a biocatalizei, productivitate mai ridicată, biocataliză secundară, ameliorarea controlului procesului, izolarea produsului cu mai mare uşurinţă, o susceptibilitate mai scăzută la contaminarea cu microorganisme etc, (KNORR, 1985). Totodată, celulele vegetale imobilizate manifestă o rezistenţă superioară la leziuni mecanice, faza de creştere se suprapune cu cea de sinteză a metaboliţilor, celulele pot fi mai uşor manipulate şi transferate în alt mediu de cultură, (VIESTURS et al., 1991).

Reacţiile de biotransformare realizate de celulele imobilizate constau în *hidroxilări, glicozilări, acetilări* şi *metilări*. Acest sistem a fost bine studiat în culturile de celule imobilizate la *Digitalis lanata*, pentru hidroxilarea unor *cardioglicolize,* (ALFERMAN, et al. 1995; KURZ, 1986; MEISS et al. 1986 etc.). Celulele imobilizate de degeţel lânos trasformă mult mai eficient, decât cele în suspensie, *metildigitoxina* (introdusă în mediu) în *metildigoxină*. Ca şi în cazul microorganismelor, liniile celulare capabile de biotransformare sunt cultivate mai întâi în vase de laborator, sunt multiplicate apoi într-un bioreactor de capacitate mică (30 litri) care constituie inoculul, după care sunt trasferate în bioreactoare de mare capacitate. În cazul culturilor cu celule imobilizate de degeţel lânos, substratul se introduce în a 5-a zi de cultivare, iar reacţia de hidroxilare a metildigitoxinei atinge un maximum după *cca* 13

Scanned with OKEN Scanner

zile, în final un litru de mediu având un conținut de *cca* 0,430 gr de metildigoxină, (ALFERMAN et al. 1985). În reacțiile de biotransformare s-au folosit şi celule ale altor specii. Astfel, la *Hyoscyamus niger* o linie celulară s-a dovedit capabilă să transforme *hiosciamina* exogenă în *scopolamină*, linii de *Datura innoxia* transformă *hidrochinona* în *arbutină*, linii celulare de *Mentha canadensis* transformă unele *terpene* în altele etc, (GHIORGHIȚĂ şi ONISEI, 1992).

2.8. Utilizarea transgenezei în terapia genică şi a cancerului la om

Rezultatele experiențelor de acest gen rămân cel mai adesea necunoscute din rațiuni diverse. Este neîndoielnic însă că tehnicile ingineriei genetice vor avea o contribuție extrem de importantă, dacă nu decisivă, la prevenirea şi tratarea unor maladii ereditare şi a unor boli grave precum cancerul, SIDA, bolile degenerative etc. Unele dintre testele efectuate în acest sens *in vitro* şi chiar *in vivo* sunt încurajatoare. Astfel, *mucoviscidoza* este o maladie ereditară care constă în inflamarea progresivă a căilor bronho-pulmonare, fapt ce duce la o insuficiență respiratorie severă şi la decesul indivizilor afectați într-un procent de peste 50% înainte de vârsta de 30 de ani. Boala este destul de răspândită în unele populații umane, afectând *cca* 1/2000 copii în populațiile din America şi Europa şi *cca* 3-5/1000 copii în populațiile caucaziene. Boala este provocată de o mutație care codifică sinteza regulatorului fibrozei chistice transmembranare (proteina CFTR) din membrana celulelor epiteliale ale bronhiilor. Proteina CFTR intervine în schimburile de apă şi ioni (Cl^- şi Na^+) între celule şi mediul intern, reglează vâscozitatea secrețiilor glandelor sero-mucoase din epiteliile respiratorii etc. De o parte şi de cealaltă a membranei celulelor se produc diferențe exagerate de potențial electric. Gena normală pentru proteina CFTR a fost inserată *in vitro* în celule epiteliale bolnave, observându-se că tulburările în transportul ionilor şi de potențial electric pot fi eliminate. Specialiştii s-au gândit la un vector capabil să transfere gena normală epiteliului respirator *in vivo*, operație care ar trebui să se repete la cca 3 luni (durata de viață a celulelor bronhice) pentru un efect de durată. Vectorii adecvați ar putea fi adenovirușii C, care au o patogenitate scăzută şi provoacă la om rinofaringite. Faptul că aceşti virusi infectează celulele neangajate în diviziune, evită riscul integrării lor în genomul celulei gazdă.

Scanned with OKEN Scanner

În 1991 s-a efectuat o experiență *in vivo* la șoarece, la care a fost transferată gena pentru proteina CFTR cu ajutorul unui adenovirus în celulele lui pulmonare (via trahee), constatându-se că proteina a fost sintetizată câteva săptămâni de către celulele epiteliului respirator. Ulterior gena a fost transferată prin adenoviruși și la șobolanul american, macac, babuin etc, cu rezultate promițătoare. Vectori de perspectivă pentru transgeneza genei CFTR par să fie și lipozomii, prin faptul că elimină riscul apariției unor reacții imunitare la receptori. În anul 1993 s-au început experiențe clinice de acest gen în SUA și Franța, (BELLON, et al. 1994).

Medicina umană se confruntă cu un număr mare de boli ereditare cărora, în cea mai mare parte, nu le-a găsit soluții pentru că sunt „bolnave" însăși genele. Soluția, care probabil va fi aplicată nu peste prea mult timp, pare a fi terapia genică. Fie va fi inserată gena normală în locul celei bolnave, fie va fi corectat efectul acesteia. Dificultățile tehnice și mai ales riscurile terapiei genice au făcut ca tehnica să nu fie încă operabilă *in vivo* la om. Cu siguranță acest moment este foarte apropiat, mai cu seamă pentru bolile cu risc mai mare decât cel presupus de tehnicile ingineriei genetice, cum ar fi cancerul, SIDA. Aceste tehnici vor fi mai ușor acceptate și pentru o serie de boli neurodegenerative (Parkinson, Alzheimer, Huntigton), boli cardiovasculare (arterosclerozã, hipercolesterolemie familială), boli cronice ca poliartrita reumatoidă etc. În problema cancerului, de exemplu, terapia genică se realizează mai ușor *ex vivo*, urmărind:

- stimularea activității sistemului imunitar împotriva celulelor tumorale;
- sensibilizarea acestor celule la drogurile care le ucid;
- blocarea oncogenelor sau activarea antioncogenelor etc.

Se pare că cea mai de perspectivă metodă este stimularea sistemului imunitar, a producerii de către celulele imunitare a *citokinelor*, care distrug tumora sau conferă celulelor tumorale un caracter mai pronunțat de „corp străin". În experiențe realizate *in vitro* se încearcă transferul genelor pentru unele citokine (*interleukinele 2 și 4*, interferonul gamma etc) în celulele canceroase, acestea fiind lipsite la suprafața lor de antigene tumorale pentru a fi recunoscute de sistemul imunitar.

Scanned with OKEN Scanner

O altă strategie pentru terapia cancerului urmăreşte "otrăvirea" tumorilor, caz în care sunt transferate în celulele tumorilor gene care determină sinteza de toxine sau gene „sinucigaşe" (care transformă o substanţă netoxică din celulă în una toxică pentru celulă). O altă strategie imaginată este transferul în celulele canceroase a genelor care inhibă proliferarea celulară (cum este gena p53).

Oricum, terapia genică a cancerului nu este o operaţie uşoară, deoarece majoritatea cancerelor reprezintă o "cascadă de anomalii genetice" şi doar corectarea uneia nu asigură succesul, (COHEN-HAGUENAUER şi BORDIGNON, 1994). Se vor imagina desigur şi alte strategii de prevenire şi tratare a cancerului pe măsură ce vor fi mai bine cunoscute mecanismele cancerizării, vor fi cartografiate genomurile unor virusuri oncogene etc. Un aport deosebit în lupta cu această boală extrem de gravă îl vor avea şi anticorpii monoclonali.

3. BIOTEHNOLOGII PENTRU PRODUCEREA DE PROTEINE, ENZIME ŞI AMINOACIZI

3.1. Producerea de proteine prin metode neconvenţionale

În secolul de care abia ne-am despărţit am asistat la o creştere demografică fără precedent, care se va accentua în deceniile care vin. Numai în ultimele 4 decenii populaţia globului s-a dublat, atingând în prezent *cca* 6,2 miliarde locuitori. Creşterea demografică reclamă şi un necesar în continuă creştere pentru alimentaţia omenirii. Consumul zilnic de proteine al omului este apreciat la 0,7-1,0 gr/1 kg corp, o alimentaţie normală cu proteine necesitând cca 100 kg/locuitor/an, (L. POPA, 1990; C. MILICĂ, 1999). Acesta înseamnă un necesar anual de proteine de cca 600 milioane tone, din care prin producţia convenţională de proteine vegetale şi animale se acoperă doar un procent de 17%. Deficitul anual de proteine convenţionale trebuie compensat prin identificarea de noi surse, semiconvenţionale sau neconvenţionale. În categoria celor semiconvenţionale sunt încadrate proteinele provenite din seminţele unor plante oleaginoase (soia), din concentratele de peşte, proteinele obţinute din subprodusele rezultate din industrializarea cărnii şi laptelui. Între sursele neconvenţionale de proteine sunt incluse cele furnizate de drojdii, mucegaiuri, bacterii, microalge, fitoplanctonul marin, (L. POPA, 1991).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a le deosebi de proteienele convenționale de origine animală și vegetală, proteinele de origine microbiană au fost denumite în anii '60 ai secolului trecut *"proteine monocelulare" ("single-cell-protein")*. Biomasa estimată în culturile de drojdii și bacterii conține însă nu numai proteine, ci și substanțe neproteice (25-50%), de aceea în prezent se folosesc termenii "single-cell-biomass" pentru produsul brut obținut în cultură și cel de "*single-cell-protein*" pentru proteina microbiană pură, (EINSELE, 1983). Utilizarea microorganismelor pentru producerea de proteine a fost preconizată încă din timpul primului război mondial, când DELBRŰCK și colaboratorii lui încercau să obțină pe scară largă proteine prin cultivarea drojdiei de bere pe diverse substrate, pentru a acoperi lipsa de alimente în Germania. De altfel, în cel de la doilea război mondial, se pare că proteinele obținute din cultivarea speciilor de levuri *Candida arobea și C. utilis* au avut un aport important în acoperirea unor nevoi alimentare în Germania, (SASSON, 1988).

3.1.1. Materii prime folosite pentru producerea de proteine monocelulare

Substraturile utilizate pentru cultivarea microorganismelor producătoare de proteine monocelulare trebuie să îndeplinească două condiții:

a) să aibă un preț de cost scăzut;
b) să fie accesibile (disponibile).

Cei mai mulți specialiști și-au îndreptat atenția spre produsele reziduale (deșeuri) care rezultă din unele industrii ca: industria alimentară, de celuloză și hârtie, petrolieră etc, și către deșeurile celulozice din agricultură. Se rezolvă în acest fel și unele probleme legate de protecția mediului. Materiile prime frecvent folosite în acest scop fac parte dintre: glucide, produse petroliere, metan, alcooli, (L. POPA, 1990).

Deșeuri de natură glucidică

Lactozerul este un subprodus rezultat din prepararea brânzeturilor, conține ca sursă de carbon lactoza și poate servi ca substrat pentru cultivarea levurilor (*Kluyveromyces fragilis, Candida pseudotropicalis*) și a mucegaiurilor (*Penicillium roquefortii, Rhizopus oligosporus*).

Scanned with OKEN Scanner

Melasa este un produs de deşeu al fabricilor de zahăr, având ca sursă de carbon zaharoza, pe care se pot dezvolta drojdii (*Candida utilis, C. arborea, C. tropicalis*) şi mucegaiuri (genul *Fusarium).*

Amidonul din apele reziduale de la fabricile de amidon poate fi folosit ca substrat pentru cultivarea drojdiilor (după o prealabilă hidroliză enzimatică a lui) şi a mucegaiurilor.

În categoria deşeurilor celulozice intră numeroase produse.

Leşiile sulfitice rezultate de la fabricile de celuloză pot fi utilizate ca substrat pentru cultivarea drojdiilor (*Candida utilis, C. tropicalis*). Dacă lemnul folosit la producerea celulozei provine de la conifere, aceste leşii conţin mai ales *manoză*, iar dacă provine de la angiosperme (plop, fag, mesteacăn) conţine mai ales *xiloză.* Se apreciază că jumătate din biomasa vegetală din agricultură şi silvicultură reprezintă un produs secundar care se foloseşte doar parţial, deşi ea constituie o rezervă importantă de carbon pe Pământ, (VIESTURS et al., 1991). În această categorie intră printre altele: rumeguşul de lemn, paiele de cereale, cojile de floarea soarelui, cocenii de porumb etc. Ele nu pot fi utilizate ca atare în hrana omului şi animalelor. În schimb, prin diverse procedee de prelucrare şi conservare, ele pot fi transformate în: proteine, biogaz, etanol, glucide, acizi organici etc. Se pare că transformarea deşeurilor celulozoligninice (CL) în proteine microbiene este rentabilă doar prin cultivarea drojdiilor pe hidrolizate acide. După unele date, microorganismele celulolitice pot utiliza ca substrat produse celulozo-ligninice dacă au un conţinut de lignină care nu depăşeşte 18-20%. De aceea, trebuie recurs la unele metode preliminare de delignificare, între care figurează şi cea biologică, prin cultivarea ciupercilor superioare care distrug lemnul.

Produse petroliere

Aşa cum menţionam la începutul acestui capitol, unele microorganisme pot folosi ca sursă de carbon produse petroliere (motorină, petrol lampant, parafine), care conţin hidrocarburi saturate aciclice (n-alcalini sau n-parafine). Ele utilizează de preferinţă n-alcalinii lichizi (cu C_{11}- C_{19} în moleculă) şi n-alcalinii solizi (cu C_{20}- C_{40} în moleculă). Metabolizarea n-alcalinilor ar avea loc prin atacul enzimatic la C_1 cu formarea unui alcool primar. Această reacţie s-ar produce prin 3 mecanisme:

Scanned with OKEN Scanner

a) printr-o oxidare în care intervine *rubredoxina* sau *citocromul P-450*;
b) prin hidroxiperoxidare;
c) prin dehidrogenare.

Capacitatea metabolizării n-alcanilor este specifică unor bacterii din genurile *Mycobacterium, Pseudomonas, Brevibacterium, Corynebacterium, Micrococcus* etc, unor drojdii din genurile *Candida, Torulopsis, Pichia, Rhodotorula* etc, unor mucegaiuri din genurile *Mucor, Fusarium, Aspergillus, Cephalosporium* etc, (L. POPA, 1990).

La începutul anilor `70 ai secolului trecut se făcuseră progrese remarcabile în punerea la punct a unor procedee de obţinere a proteinelor folosind ca producători levurile, ca sursă de azot sărurile amoniacale, iar ca sursă de carbon hidrocarburile. Deşi în 1973 s-a înregistrat o criză a petrolului, fapt ce a determinat creşterea preţului acestuia, unele companii s-au arătat interesate şi dispuse să investească în acest domeniu extrem de promiţător. Una dintre acestea a fost British Petroleum, care pe lângă producerea de proteine cu ajutorul microorganismelor, urmărea şi deparafinarea petrolului de către o levură - *Candida lipolytica* (numită mai apoi *Yarrowia lipolytica* şi *Sccharomycopsis lipolytica)*. În 1976 s-a constutuit la Lavera o uzină ce producea în fermentatoare *cca* 20.000 tone proteine/an, folosind ca substrat motorina, produsul obţinut fiind comercializat sub numele de *Toprina.* Între timp (în 1975) aceeaşi companie, împreună cu una din Italia, formau Societatea Italproteine şi construiau la Sarroch, în Sardinia, o uzină în care, cu ajutorul levurilor şi folosind ca substrat n-parafinele, produceau 100.000 tone/an proteine, (SASSON, 1988). O astfel de uzină, cu tehnologie japoneză şi având ca substrat parafinele, a funcţionat în anii `80 ai secolului trecut şi în România (la Curtea de Argeş), având o capacitate de *cca* 60.000 tone/an. În aceeaşi perioadă (anii `70 ai secolului XX), a început să se acorde atenţie utilizării şi altor substraturi microbiene pentru fabricarea de proteine microbiene.

Metanul

Capacitatea de a utiliza metanul ca sursă de carbon este specifică bacteriilor metilotrofe, care sunt bacterii Gram-negative, strict aerobe, nesporulate, pigmentate roz sau brun. Deşi metanul ridică unele probleme la construirea bioreactoarelor, deoarece se află sub formă gazoasă, este totuşi avantajos pentru producerea de proteine microbiene,

Scanned with OKEN Scanner

întrucât are preţ de cost scăzut, iar produsul finit nu conţine reziduuri, cum e cazul proteinelor din n-parafine.

Microorganismele metilotrofe (bacterii şi drojdii) au capacitatea de a metaboliza compuşii cu un singur atom de carbon, cum sunt: *metanul, metanolul* şi *metilamina*. Bacteriile metilotrofe pot fi *obligat metilotrofe*, care se dezvoltă doar pe substraturile menţionate şi *facultativ metilotrofe*, care pot folosi şi alte surse de carbon şi energie. Din prima categorie fac parte bacterii din genurile *Methylococcus, Methylocystis* etc, iar din a II-a categorie bacterii din genurile *Pseudomonas, Corynebacterium, Micrococcus, Streptomyces* etc.

Metanul este oxidat mai întâi la metanol, prin intervenţia unei enzime specifice, *metan-monooxigeneza*. Enzima cheie în acest proces este *metanol-dehidrogeneza* pentru bacteriile metilotrofe, în timp ce la levurile metilotrofe transformarea metanolului în aldehidă formică este catalizată de *metanol-oxidază*. Metanul şi metanolul pot să fie utilizaţi de către microorganismele metilotrofe şi ca sursă de carbon pentru sinteza constituienţilor celulari. Aceasta presupune sinteza de compuşi C_3 din compuşi C_1, procesul fiind realizat pe trei căi posibile:

- prin ciclul lui *Calvin* (ribulozo-difosfat), în care are loc încorporarea compusului C_1 (sub formă de CO_2) într-un glucid-fosforilat;
- prin ciclul *Quayle* (ribulozo-monofosfat), în care compusul C_1 sub formă de formaldehidă este încorporat într-un glucid fosforilat;
- prin încorporarea compusului C_1, aflat sub formă de formaldehidă, într-un aminoacid.

Din cele 3 mecanisme, cel mai eficient şi frecvent întâlnit la bacteriile şi drojdiile metilotrofe este ciclul Quayle (ribulozo-monofosfat), (L. POPA, 1990).

Alcoolii

În producerea de proteine microbiene pot fi folosiţi ca substrat şi unii alcooli, în special metanolul şi etanolul. În acest sens, metanolul apare ca sursă ideală, deoarece are o mare solubilitate în apă, poate fi obţinut prin sinteză la un preţ scăzut, metabolizarea lui necesită un consum mai mic de oxigen decât în cazul metanului, evită pericolul unor explozii care sunt posibile la folosirea metanului, nu lasă reziduuri în celulă etc.

Scanned with OKEN Scanner

În afara bacteriilor obligat şi facultativ-metilotrofe (care se dezvoltă şi pe metan), pe metanol se dezvoltă şi unele drojdii facultativ metilotrofe care aparţin genurilor: *Candida (C. boidinii, C. methanolica), Hansenula (H. capsulata), Torulopsis (T. glabrata), Pichia (P. pinus)* şi *Kloeckera,* (N. TOPALĂ, 1982).

După cum arată SASSON (1988) metanolul (şi nu metanul) este adevăratul substrat pentru producerea proteinelor microbiene. Metanul este transformat prin oxidare în metanol pentru a nu lua foc în amestec cu aerul. Firmele *Hoechst* din Germania şi *Imperial Chemical Industries* din Marea Britanie au fost primele care au produs în anii 1970 proteine monocelulare, folosind ca sursă de carbon metanolul.

În acest proces s-a utilizat tulpina AS_1 a bacteriei *Methylophilus methylotrophus* care, cu ajutorul *glutamin-sintetazei (GS)* şi *glutamat-sintazei (COGAT),* asimilează amoniacul din mediul de cultură, cu formarea de acid glutamic. Alte bacterii folosesc *glutamat-dehidrogeneza (GDH)* la sinteza acidului glutamic plecând de la amoniac. Specialiştii au izolat o mutantă auxotrofă a tulpinei AS_1, lipsită de enzima COGAT şi incapabilă de transformarea amoniacului, şi i-au transferat gena GDH de la bacilul colic prin intermediul unei plasmide, fapt ce a redus consumul de energie pentru sinteza acidului glutamic din amoniac. La începutul anilor 1980, firma britanică Imperial Chemical Industries construia la Billingham o uzină pentru biosinteza masivă a proteinelor microbiene, a cărei capacitate de producţie era de 50 de mii de tone anual, proteina fiind comercializată sub denumirea de *Pruteen,* (SASSON, 1988).

3.1.2. Microorganisme folosite în producerea de proteine monocelulare

Pentru obţinerea de proteine prin fermentaţia diverselor substraturi de către microorganisme se folosesc linii selecţionate ale acestora, care să îndeplinească anumite condiţii, ca:

- să asigure biosinteza unui conţinut înalt de proteine (50-60% din biomasa lor), proteine care să aibă în constituţia lor un procent ridicat de aminoacizi esenţiali;
- să manifeste stabilitate în cultură şi rezistenţă la toxine şi la contaminarea cu alte microorganisme;
- să metabolizeze substraturi disponibile şi ieftine;

Scanned with OKEN Scanner

- să prezinte o capacitate ridicată de creştere şi înmulţire şi să producă o cantitate mare de biomasă;
- proteinele produse să prezinte digestibilitate uşoară şi un gust acceptabil etc, (L. POPA, 1990).

Microorganismele utilizate în producerea de proteine furajare ş alimentare fac parte dintre bacterii, drojdii, mucegaiuri şi microalg Despre unele dintre acestea am discutat deja în capitolul anterior.

Bacteriile furnizează o cantitate mare de proteine (47- 87% din greutatea lor), cu un conţinut ridicat în lizină şi unul acceptabil în metionină şi triptofan. Ele produc de asemenea vitamine din grupul B. Utilizarea bacteriilor în producerea de proteine este avantajoasă, deoarece cresc şi se înmulţesc rapid, dar au dezavantajul că se separă mai greu din mediul de cultură (datorită dimensiunilor lor foarte mici, comparativ cu levurile, de exemplu) şi că au un conţinut ridicat de acizi nucleici (care pot antrena tulburări ale metabolismului uric în organismele animale hrănite cu astfel de proteine).

Pentru producerea de proteine monocelulare se folosesc bacterii strict aerobe, care aparţin genurilor: *Pseudomonas, Corynebacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Methylomonas, Methylophilus, Methylococcus, Arthrobacter, Cellulomonas* etc şi cianobacterii (bacterii albastre-verzi) din genurile: *Nostoc, Oscillatoria, Spirulina.*

Substratul cel mai folosit pentru cultivarea bacteriilor este metanolul, dar în funcţie de specie pot fi utilizate şi alte materii prime ca: deşeurile celulozice, n-parafinele din petrol, metanul etc, (aşa cum s-a prezentat în capitolul anterior).

O atenţie specială s-a acordat în ultimele două decenii şi se acordă încă producerii de proteine prin cultivarea cianobacteriei *Spirulina*, de care ne vom ocupa într-un capitol aparte.

Drojdiile (levurile) prezintă un conţinut de proteină apreciat la 46-50% din biomasa lor, iar această proteină are un nivel ridicat în lizină şi relativ scăzut în metionină şi triptofan. Ele sintetizează totodată cantităţi mari de vitamine B, ergosterol şi alte substanţe de interes economic. Cea mai folosită drojdie în industria de profil este *Candida utilis*. Se mai utilizează drojdii din genurile *Saccharomyces, Torulopsis, Hansenula* şi *Pichia.*

Drojdiile reprezintă microorganismele cele mai studiate şi folosite în producerea de proteine monocelulare, pentru că sunt lipsite de

Scanned with OKEN Scanner

toxicitate, sunt mai uşor de separat din mediul nutritiv (fiind de dimensiuni superioare bacteriilor) şi au un conţinut mai scăzut în acizi nucleici (5-10%). Atât drojdiile furajere (utilizate în nutriţia animalelor), cât şi cele alimentare (folosite în nutriţia omului) se obţin prin procedee tehnologice asemănătoare, diferă doar substratul (materia primă) utilizat şi gradul de purificare (rafinare) a produsului final. Drojdia alimentară se obţine prin folosirea ca substrat a melasei sau lactozerului. Pentru stimularea creşterii, înmulţirii şi acumulării de biomasă, drojdiile se cultivă în condiţii de aerare puternică şi nivel scăzut de zahăr în mediul nutritiv, pentru inhibarea capacităţii de sinteză a alcoolului. Acest procedeu a fost folosit prima dată pentru fabricarea drojdiei de bere *(Saccharomyces cerevisiae)* comprimate şi este folosit şi în prezent pentru producerea de drojdie alimentară şi furajeră pe substrat glucidic, (L. POPA, 1990). Ca surse de azot în cultivarea microorganismelor (inclusiv a drojdiilor) se folosesc amoniacul, sărurile de amoniu sau ureea.

Ulterior s-au dezvoltat procedee de cultivare a drojdiilor pe petrol brut (procedeul folosit la Lavera) şi pe n-parafine purificate (procedeul de la Gragemouth, Scoţia). În primul caz, produsul finit conţine şi unele cantităţi de hidrocarburi aromatice (toxice pentru animale), fapt ce impune operaţiuni suplimentare de purificare a lui.

Pentru producerea industrială a drojdiilor furajere sau alimentare sunt parcurse mai multe etape;

- pregătirea inoculului, care constă în obţinerea unei culturi pure de drojdie pe substrat format din malţ-agar sau geloză glucozată;
- însămânţarea bioreactoarelor (dintre care cele mai utilizate sunt *Vogelbusch* şi *Lefrancois*, care realizează o foarte bună aerare a mediului) de mare capacitate şi producerea de biomasă de drojdie;
- separarea prin centrifugări şi spălări repetate a biomasei de mediul de cultură;
- purificarea biomasei (prin eliminarea hidrocarburilor reziduale şi lipidelor, în cazul folosirii anumitor substraturi, care dau gust neplăcut produsului) cu ajutorul unor solvenţi specifici (etanol, butanol, hexan etc);
- prelucrarea biomasei, care constă în plasmoliza celulelor de drojdii şi uscarea (prin pulverizare) a produsului obţinut.

Scanned with OKEN Scanner

Produsul finit (drojdia alimentară sau furajeră) conţine *cca* 50% proteine, 25-30% glucide, 6% acizi nucleici, 2-3% lipide, 6-8% săruri minerale, vitamine din grupul B şi se prezintă sub formă de praf brun-gălbui cu un miros specific, (L. POPA, 1990).

Mucegaiurile au un conţinut de *cca* 20-40% proteine, care au în compoziţia lor o cantitate bună de lizină şi una mai scăzută de metionină şi triptofan. Pe lângă proteine şi mucegaiurile produc vitamine din grupa B. Structura filamentoasă a acestor organisme permite o separare mai uşoară a biomasei din mediu şi în plus au un conţinut mai scăzut, decât bacteriile şi drojdiile, în acizi nucleici. Dintre mucegaiurile mai folosite în producerea de proteine fac parte: *Rhizopus, Penicillium, Fusarium.*

3.1.3. Condiţii ce trebuie îndeplinite de proteinele monocelulare pentru a fi folosite

Pentru a fi utilizate în furajarea animalelor şi în alimentaţia omului, proteinele monocelulare trebuie să îndeplinească o serie de condiţii ca: valoarea nutritivă, toxicitatea, digestibilitatea, acceptabilitatea etc, (L. POPA, 1990).

Valoarea nutritivă constă în cantitatea de proteină existentă în celula microorganismului cultivat şi în conţinutul ei în aminoacizi esenţiali. După cum s-a constatat deja, proteinele monocelulare au un conţinut bun în lizină, dar inferior în aminoacizii cu sulf (metionină, cistină, triptofan) faţă de proteinele convenţionale (din făină de soia sau de peşte) sau proteina de referinţă FAO. Valoarea nutritivă a proteinei microbiene este determinată prin teste efectuate pe animale (prin administrarea în hrană a acestor proteine), urmărindu-se sporul lor în greutate, creşterea rezistenţei la îmbolnăviri, a producţiei de lapte, de ouă etc. Valoarea nutritivă a proteinelor monocelulare creşte prin suplimentarea lor cu metionină (adaosul de 0,3% metionină determină o creştere a valorii nutritive a acestor proteine de la 61 la 91).

Toxicitatea este poate cea mai importantă condiţie, proteinele microbiene trebuind să fie lipsite de toxicitate pentru a fi folosite în hrana animalelor. Testele de toxicitate se aplică pe animale de experienţă (şobolani) şi includ *toxicitatea acută* (testul durează 6 săptămâni), *subcronică* (testele durează 3 luni) şi *cronică* (testele durează 2 ani). Aceste teste se impun în cazul tuturor proteinelor de origine microbiană, dar mai ales când sunt obţinute din produse petroliere, care ar putea

Scanned with OKEN Scanner

conţine reziduuri de compuşi aromatici policiclici, cu efect cancerigen. Standardele Uniunii internaţionale de chimie pură şi aplicată (IUPAC) admit cantităţi sub 5 ppb (părţi per bilion) de astfel de compuşi. În cazul producerii de proteine monocelulare pe metan şi metanol, standardele prevăd de asemenea cantităţi mici de metanol rezidual şi formaldehidă, sub 22 ppm (părţi per milion). Produsul finit trebuie să fie de asemenea lipsit de microorganisme dăunătoare pentru sănătate.

Digestibilitatea. Din cauza naturii pereţilor celulelor microbiene (în cea mai mare parte celulozică), ele sunt greu de digerat şi de aceea pot provoca deranjamente gastro-intestinale. Prin plasmoliză la 64^0C are loc la drojdii eliberarea conţinutului celular de membrana celulară.

Acceptabilitatea este o condiţie importantă în utilizarea proteinelor monocelulare şi se referă la acceptarea consumului lor de către animale sau oameni. Dacă la animale contează mai ales gustul, hrănirea lor cu drojdii furajere fiind o problemă mai uşor de rezolvat, pentru oameni contează în plus mirosul, aspectul, culoarea, consistenţa, aroma etc. S-a constatat că proteinele furnizate de *Candida arborea* şi *C. utilis* au un gust plăcut. Administrarea lor în alimentaţia omului se poate face sub diverse forme: prin încorporarea în mâncare, lapte, includerea în produse de patiserie, în sandviciuri etc. Se consideră că un aport zilnic de 15 grame proteine de drojdie, echivalează cu 40 grame proteine din carne. Utilizarea proteinelor monocelulare în hrana animalelor şi oamenilor are un viitor asigurat, având în vedere „foamea" de proteine existentă în prezent în anumite zone ale lunii şi nevoile în continuă creştere datorate sporului demografic. Se va schimba probabil şi comportamentul alimentar al omului, pentru că nu e de neglijat randamentul de producere a proteinelor microbiene comparativ cu cele obţinute din creşterea animalelor, de exemplu. Aşa cum arăta SASSON (1988) găina pentru carne consumă în două luni cca 8,4 kg de proteine vegetale şi realizează o greutate de cca 2 kg carne în acest interval; un bou de 500 kg produce în 24 de ore 400-500 grame de proteină animală. În acelaşi interval de timp cultivarea unei cantităţi echivalente de drojdii (500 kg) produce o biomasă de 80 de tone (din care 40-50% sunt proteine).

Scanned with OKEN Scanner

3.1.4. Cultura de cianobacterii şi microalge

Culturile masive de cianobacterii şi microalge se deosebesc destul de mult de cele de bacterii şi levuri şi reclamă alte condiţii, (de aceea am considerat că acest aspect trebuie tratat separat). Producţia în acest caz este un rezultat al fotosintezei şi de aceea ea este discontinuă, depinde de condiţiile de iluminare şi de suprafeţele de cultivare ocupate de ape. Se apreciază că anual, prin cultivarea cu cianobacterii sau alge a unui hectar de luciu de apă, se poate asigura o producţie de 18 tone proteine, cantitate echivalentă cu cea obţinută prin cultivarea porumbului pe o suprafaţă de 30 ha, (CRĂCIUN, 1983). Dintre cianobacterii cea mai cultivată este *Spirulina*, iar dintre microalge sunt *Chlorella* şi *Scenedesmus*. Efortul financiar pentru producerea unei tone de biomasă prin cultivarea acestor organisme este apreciat la 370$ pentru *Spirulina*, la 340-520$ pentru *Chlorella* şi la 700$ pentru *Scenedesmus,* (SOEDER, 1978). S-a observat de asemenea că făina de *Scenedesmus* se poate constitui într-o sursă complementară de proteine la om, fiind bine tolerată de organism şi lipsită de toxicitate, (GROSS et al. 1978; KOFRANYI, 1978). Se pare că producerea de biomasă de către *Chlorella* şi *Scenedesmus* nu a depăşit faza de staţie pilot, din cauza preţului de cost ridicat al biomasei algale, (O. BOLDOR, 1990).

De un interes cu totul special s-a bucurat în ultimele două decenii *Spirulina.* Însuşirile nutritive ale acestui gen de cianobacterii erau cunoscute şi valorificate încă din vremuri străvechi de populaţii autohtone aflate la o distanţă între ele de cca 10.000 de km. Astfel, în secolul al XVI-lea conchistadorii spanioli aveau să constate că băştinaşii din jurul lacului Texcoco din Mexic preparau din filamentele uscate la soare ale speciei *Spirulina geitleri (S. maxima)* recoltate din apa lacului, nişte turte ("biscuiţi") de culoare albastră sau verde (denumiţi *tecuitatl*). Mult mai târziu (în secolul XX), expediţiile transsahariene aveau să descopere că băştinaşii din jurul lacului Ciad preparau din filamentele uscate ale unei specii asemănătoare, *Spirulina plantensis*, pesmeţi (*dihé*) folosiţi în alimentaţie. Se pare că ambele specii sunt utilizate din vremuri imemoriale de populaţiile umane din zona celor două lacuri. În ambele situaţii, apele în care creşteau cele două specii erau alcaline (pH=cca 11,0), fapt ce favoriza monocultura şi evita contaminarea biomasei cu alte specii. Dar cel mai important aspect ce avea să fie constatat a fost acela că „biscuiţii" respectivi aveau un conţinut de proteine foarte ridicat

Scanned with OKEN Scanner

(peste 60% din substanța uscată). Constatarea a atras atenția specialiștilor asupra unei surse extrem de valoroase de proteine și a determinat un efort intens de cercetare (în condiții de laborator, stații pilot și în instalații amenajate sub cer deschis) pentru determinarea productivității spirulinelor în diverse condiții de cultivare și a compoziției lor în substanțe utile (în special în proteine).

Investigațiile întreprinse în ultimii cca 35 de ani aveau să confirme faptul că atât spirulinele recoltate din mediul lor natural, cât și cele obținute în culturi experimentale reprezintă o sursă extrem de valoroasă de proteine. Studiul compoziției lor chimice avea să evidențieze că biomasa uscată conține: cca 60-65% proteine (procent superior semințelor de soia), 19% glucide, 6% pigmenți, 4% lipide, 3% fibre, 4% acizi nucleici, 3% cenușă etc. Conținutul mai scăzut în acizi nucleici (4%), inferior celui realizat în culturile de levuri (cca 10% acizi nucleici), reprezintă încă un avantaj al spirulinelor. S-a constatat de asemenea că, deși proteina de spirulină nu conține lizină, ea este totuși echilibrată în compoziția în aminoacizi (inclusiv în metionină și triptofan; vezi tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Aminoacizii esențiali din biomasa de *Spirulina platensis* în comparație cu cei din alte produse alimentare

Aminoacizi esențiali (% din proteină)	*Spirulina*	Lapte de vacă	Ouă	Carne de vacă	Făină de soia
Fenilalanină	4,97	6,4	6,0	4,0	4,95
Izoleucină	6,03	6,4	6,8	5,2	5,30
Leucină	8,02	9,9	9,0	8,0	7,70
Lizină	1,59	7,8	6,3	8,4	6,30
Metionină	1,37	2,4	3,1	2,4	1,37
Treonină	4,56	4,6	5,0	4,3	3,95
Triptofan	1,40	1,4	1,7	1,2	1,49
Valină	6,49	6,6	7,4	5,5	3,45
Proteină (% din biomasa uscată)	65	35	19	74	38

În plus, biomasa de spirulină reprezintă și o sursă valoroasă de vitamine, în special de vitamina B_{12} (o cantitate dublă față de cea din ficat, considerat cea mai bună sursă), dar și de vitamine B_1, B_2, B_6, D, E, PP și β-caroten (provitamina A). Nu este de neglijat nici faptul că biomasa de *Spirulina* are un conținut ridicat de fier, nu conține

Scanned with OKEN Scanner

colesterol, iar printre acizii graşi cel mai bine reprezentat este acidul $\wp$-linolenic (considerat a face parte dintre substanţele vitagene).

Cercetări ample efectuate în culturi de *Spirulina* controlate au dus la stabilirea unor tehnologii de cultivare a acesteia. Pe baza studiilor fizico-chimice a apelor în care cresc natural aceste cianobacterii, a analizei macro- şi microelementelor din compoziţia biomasei lor, s-au elaborat formule de medii nutritive adecvate culturii spirulinelor. S-a constatat că mediul *Zarrouk* asigură condiţii optime pentru culturile intensive de *Spirulina*, (tabelul 3.2)

Tabelul 3.2. Compoziţia mediului Zarrouk

Soluţia cu macroelemente*		Soluţiile de microelemente	
Substanţe	Cantitate (g/l)	Substanţe	Cantitate(g/l)
$NaHCO_3$	16,80	**Soluţia I**	
K_2HPO_4	0,50	H_3BO_3	2,860
$NaNO_3$	2,50	$MnCl_2 . 4H_2O$	1,810
K_2SO_4	1,00	$ZnSO_4 . 7H_2O$	0,220
NaCl	1,00	$CuSO_4 . 5H_2O$	0,080
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,20	MoO_3	0,015
$CaCl_2$	0,04	**Soluţia II**	
$FeSO_4 . 7H_2O$	0,01	NH_4NO_3	0,023
EDTA	0,08	$K_2Cr_2(SO_4).24H_2O$	0,096
*La această soluţie se adaugă câte 1ml/l din soluţiile cu microelemente I şi II		$NiSO_4 . 7H_2O$	0,04785
		$Na_2WO_4 . 2H_2O$	0,01794
		$Ti_2(SO_4)_3$	0,040
		$Co(NO_3)_2 . 6H_2O$	0,0044

Mediul este alcalin (pH=8) datorită conţinutului ridicat de bicarbonat de sodiu şi alcalinitatea lui creşte pe parcursul cultivării spirulinei (la pH=11) din cauza folosirii bicarbonatului ca sursă de carbon în fotosinteză. Pentru realizarea unui ritm ridicat de creştere şi înmulţire a spirulinei trebuie menţinută concentraţia macro- şi microelementelor din mediul nutritiv în anumite limite. Se caută soluţii pentru micşorarea preţului de cost a biomasei de spirulină prin folosirea unor ape minerale, a apei de mare, a unor ape reziduale ce conţin substanţe minerale etc, la prepararea mediilor de cultură, care să reducă aportul de nutrienţi minerali.Temperatura medie de creştere şi înmulţire a spirulinei este de 35^0C. Valorile mai scăzute sau mai mari ale temperaturii de cultivare influenţează negativ aportul de biomasă. S-au imaginat în acest sens soluţii pentru creşterea temperaturii prin

Scanned with OKEN Scanner

specularea efectului de seră (în zonele temperate, de exemplu). Lumina reprezintă un factor extrem de important pentru creşterea şi înmulţirea spirulinei, intensitatea luminoasă optimă fiind în jur de 25.000 lucşi. S-a constatat că există o interdependenţă între densitatea indivizilor în mediul de cultură, intensitatea luminii şi aportul de biomasă. Pe măsura creşterii densităţii indivizilor, intensitatea fotosintezei se reduce chiar în condiţiile unei iluminări optime, deoarece indivizii se umbresc reciproc, (BOLDOR, 1990).

Instalaţiile pentru cultura spirulinei pot fi de tip deschis şi închis. În primul caz, ele sunt reprezentate de bazine cu adâncime mică, confecţionate din beton sau din alte materiale, căptuşite la interior cu materiale inerte chimic, prevăzute cu sisteme de agitare a suspensiei microbiene şi de barbotare a aerului îmbogăţit în CO_2 (pentru creşterea capacităţii fotosintetice). În 1969, Institutul Francez al Petrolului făcea primele experienţe de cultivare a spirulinei în bazine de dimensiuni relativ mici (15 – 100 m^2), vara, sub cerul liber. Bazine de cultivare a spirulinei, care folosesc palete pentru asigurarea culturii, au fost imaginate şi utilizate şi în ţara noastră (fig. 3.1) la Institutele de cercetări biologice Bucureşti şi Cluj-Napoca, la Staţiunea de cercetări "Stejarul" - Pângăraţi etc.

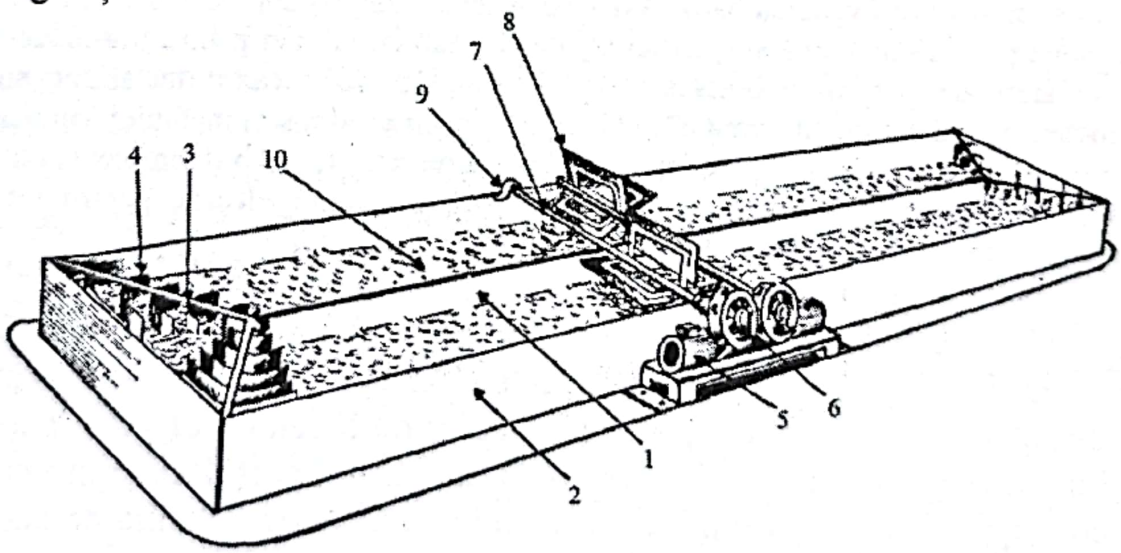


Fig. 3.1. Instalaţie de tip bazin, prevăzută cu palete pentru agitarea suspensiei algale (după BOLDOR, 1990)

1 - perete median despărţitor; 2 - peretele bazinului de cultură; 3 - cadru de susţinere a aripioarelor de dirijare a suspensiei algale; 4 - aripioare deviatoare; 5 - motor electric; 6 - reductor de turaţie; 7 - ax pentru susţinerea paletelor de agitare a suspensiei algale; 8 - palete (zbaturi); 9 – suport pentru susţinerea axului cu zbaturi; 10 - suspensie algală.

Scanned with OKEN Scanner

Instalaţiile de tip închis pentru cultivarea spirulinei (fig. 3.2) sunt reprezentate de recipiente din sticlă sau din material plastic transparent, prevăzute cu conducte pentru admisia mediului nutritiv şi evacuarea biomasei, pentru barbotarea aerului îmbogăţit în CO_2, care pot fi automatizate.

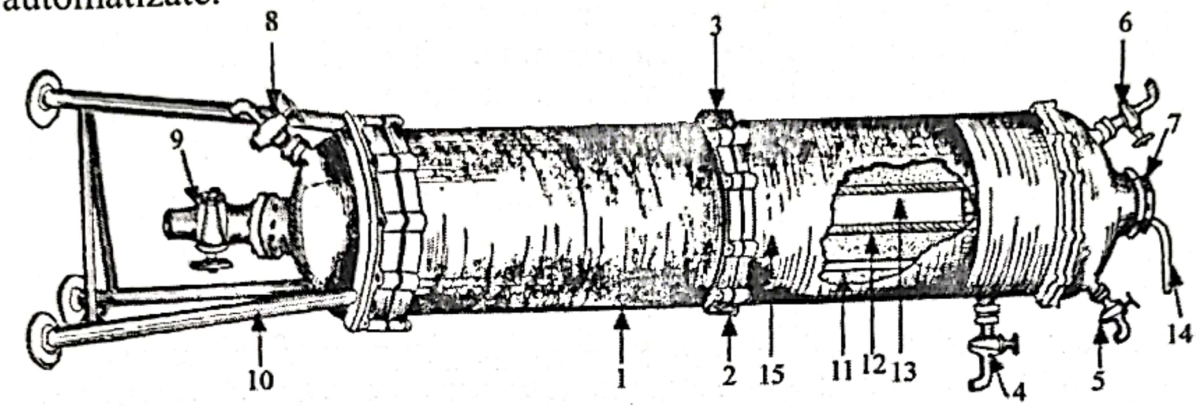


Fig. 3.2. Instalaţie de tip coloană pentru cultivarea intensivă a spirulinelor (după BOLDOR, 1990)

1 - recipient din sticlă pentru cultura algală; 2 - flanşe de prindere a tuburilor recipientului; 3 - garnituri pentru etanşare; 4 - tub de preaplin, prevăzut cu robinet; 5 - tub cu robinet pentru admisia mediului nutritiv; 6 - tub cu robinet pentru evacuarea aerului administrat în vederea barbotării suspensiei algale; 7 - dop de cauciuc; 8 - tub cu robinet pentru recoltarea suspensiei algale; 9 - tub cu robinet pentru introducerea aerului sterilizat pentru barbotarea suspensiei algale; 10 - cadru metalic pentru susţinerea recipientului de cultură; 11 - tub pentru admisia mediului nutritiv; 12 - manşon din sticlă pentru protejarea tubului fluorescent; 13 - tub fluorescent pentru iluminarea suplimentară a suspensiei algale; 14 - conductor electric pentru tubul fluorescent; 15 - suspensie algală.

Unele instalaţii sunt dotate în interior cu tuburi fluorescente pentru creşterea intensităţii de iluminare a suspensiei. Controlul densităţii cianobacteriilor în instalaţie poate fi asigurat de o celulă fotoelectrică şi în funcţie de densitate se poate regla automat aportul de nutrienţi, evacuarea unei cantităţi din biomasă acumulată etc. Instalaţiile de acest tip sunt însă de dimensiuni incomparabil mai mici decât bazinele deschise şi mult mai costisitoare, ceea ce ridică preţul de cost al produsului. Se recomandă recoltarea biomasei în faza de creştere exponenţială a cianobacteriilor.

Operaţia de recoltare se poate face la interval de 3 – 10 zile, în funcţie de condiţiile de cultivare (nutriţie, lumină, temperatură). O atenţie deosebită trebuie acordată calităţii produsului final, încărcăturii în

Scanned with OKEN Scanner

eventuale microorganisme patogene, metale grele etc. Biomasa recoltată se supune uscării rapide prin liofilizare sau atomizare, iar pulberea obținută se păstrează în pungi din polietilenă bine închise, (BOLDOR, 1990). Acțiunea de uscare poate fi realizată și prin alte metode, inclusiv prin uscarea la soare.

Valoarea proteică a acestei cianobacterii nu putea fi ignorată, astfel că exploatarea ei industrială a devenit inevitabilă. În 1967 se recolta spirulina de pe o suprafață de 900 ha din lacul Texcoco, unde biomasa se dubla la fiecare 3 – 4 zile. Firma mexicană Sosa Texcoco construia (în colaborare cu Institutul Petrolului din Franța) prima uzină pilot, care a fost pusă în funcțiune în 1973 și producea 150 tone spirulină, iar în 1982 urma să producă 1000 tone/an (în valoare de cca 15 milioane dolari). Importatorii aveau să fie: SUA, Japonia, țările Europei Occidentale.

În 1982 numeroase țări, inclusiv România, au trecut la cultura spirulinei în condiții artificiale, în sisteme deschise și închise, și pe suprafețe diverse. S-au elaborat de altfel, tehnologii pentru cultivarea spirulinei în lacuri și mlaștini cu ape alcaline, în apele încălzite provenite de la centralele termice. Prin izolarea unor tulpini mai productive se așteaptă producții care să atingă până la 20 tone biomasă/ha. Testele efectuate pe animale hrănite cu *Spirulina* (100% proteine în rația alimentară) au evidențiat ritmuri de creștere asemănătoare cu cele înregistrate în regimul obișnuit de hrănire, lipsa unor anomalii sau efecte patologice. Rezultate deosebite s-au obținut prin administrarea de biomasă de spirulină în furajarea găinilor ouătoare și a peștilor. Prin conținutul înalt de proteine, dar și de săruri minerale și vitamine, furajarea găinilor cu biomasă de *Spirulina* a dus la creșterea calității ouălor (gălbenușul se colorează mai intens).

Se consideră că *Spirulina* constituie o sursă extrem de valoroasă de proteine pentru țările care au condiții favorabile de climă pentru cultivarea ei sub cer deschis și care au dificultăți în satisfacerea nevoilor de hrană a populației. Spirulina este dealtfel privită ca un posibil aliment de viitor. În unele țări a fost introdusă ca adaos în diverse produse alimentare. S-a trecut de asemenea la fabricarea de tablete și capsule cu pulberi de *Spirulina*, suplimentate cu vitaminele A și C, distribuite în special prin magazinele de alimentație dietetică. Se pare că pulberile de *Spirulina* inhibă apetitul și pot fi folosite în curele de slăbire, au efecte pozitive în combaterea crampelor musculare la sportivi, pot fi utilizate în

Scanned with OKEN Scanner

tratamentul diabetului zaharat, a pancreatitelor, anemiilor, ulcerului gastric etc. În prezent, la noi în ţară, unele firme ("Hofigal" Bucureşti, "Plantavorel" Piatra Neamţ etc.) comercializează produse cu pulberi încapsulate de spirulina pentru uz uman, cu efect energizant, stimulator, revitalizant, detoxifiant etc.

3.2. Biotehnologii de producere a enzimelor

Enzimele sunt macromolecule complexe, cu rol esenţial în desfăşurarea proceselor metabolice din organismele vii. Ele sunt constituite dintr-o parte proteică şi una neproteică, aceasta din urmă cu rol în cataliza unor reacţii specifice. Apariţia enzimelor pe scara evoluţiei a eficientizat sistemele biologice, a crescut randamentul acţiunii catalitice exercitate (probabil) în momentul apariţiei vieţii pe Pământ de substanţe de natură anorganică. Enzimele participă în organism atât la procese de degradare a unor substanţe mai complexe în unele mai simple, cu eliberarea de energie legată sub formă chimică, cât şi la sinteza din substanţe simple a unor compuşi specifici fiecărui organism, folosind energia eliberată din procesele de oxido-reducere celulară. Semnificaţia enzimelor în economia organismelor vii este enormă. Nu există proces biologic în care să nu fie implicată una sau mai multe enzime şi nici compus sau produs biologic în care să nu intervină enzimele. Acizii nucleici înşişi sunt rodul acţiunii unui număr mare de enzime, iar rolul lor în celulă nu poate fi exercitat fără aportul enzimelor. Viaţa, sub toate manifestările ei actuale nu poate fi concepută fără intervenţia (participarea) enzimelor.

Faţă de catalizatorii chimici, enzimele au o mare specificitate de reacţie, asigurând sinteza unui compus unic, fără prezenţa de produşi secundari, care scad randamentul unui proces biotehnologic. În plus, faţă de unele procese tehnologice (să spunem de exemplu, cele de sinteză chimică), care necesită temperaturi şi presiuni înalte, reacţiile enzimatice se produc la temperaturi biologice (care nu depăşesc 50-60^{0}C), presiune normală şi un pH situat între 5,0 şi 5,9. Progresele înregistrate în domeniul biochimiei fundamentale în ultimele 5 decenii au evidenţiat noi domenii (procese biotehnologice) în care pot fi "puse la lucru" enzimele de origine diversă: în industria alimentară, farmaceutică, în producerea de energie, în protecţia mediului, agricultură, în industria pielăriei, a detergenţilor etc. Enzimele por fi extrase din celulele animale, vegetale şi

Scanned with OKEN Scanner

pot fi produse de microorganisme. Dacă la un moment dat enzimele de proveniență animală şi vegetală au avut o pondere mai mare în producție, în momentul de față cele mai multe din enzimele utilizate în diverse procese biotehnologice sunt de origine microbiană. O excepție e reprezentată de *papaină,* utilizată în frăgezirea cărnii, care este extrasă din papaia. De origine microbiană şi în cantități mari sunt produse: proteazele, amiloglucozidazele, amilazele, glucozizomeraza etc, în cantități care ating zeci şi sute de tone anual în lume, şi care aduc beneficii importante producătorilor.

Enzimele de origine microbiană le-au înlocuit pe cele de origine vegetală şi animală deoarece:

- microorganismele cresc şi se înmulțesc rapid;
- pot fi cultivate pe medii ieftine;
- producția lor poate fi sporită considerabil prin modificarea genomului acestora şi a condițiilor de cultivare etc.

Aşa se face că amilazele extrase din semințele germinate de grâu şi orz, necesare în industria berii, industria de panificație, industria textilă au fost înlocuite de cele produse de specii de *Bacillus* şi *Aspergillus*; proteazele din *Bacillus licheniformis* şi *Aspergillus sp.* au înlocuit enzimele pancreatice necesare în tăbăcirea pieilor, fabricarea detergenților; reninele din *Mucor sp.* au înlocuit cheagul în fabricarea brânzeturilor etc, (SASSON, 1988). Din cele cca 2000 de enzime cunoscute, doar cca 200 sunt utilizate în procesele biotehnologice. Majoritatea acestora sunt de origine microbiană. Dintre cele de origine vegetală, sunt utilizate amilaza din malț, papaina din papaia etc, iar de origine animală, *renina, pepsina* şi *tripsina.*

De interes deosebit se bucură în ultimul timp obținerea enzimelor de la unele bacterii *extremofile.* De perspectivă apare astfel, folosirea bacteriei hipertermofile *Pyrococcus furiosus* pentru simplificarea conversiei amidonului în derivați zaharați (maltoză, glucoză, fructoză). S-a obținut deja de la o bacterie termofilă modificată genetic o ∝-amilază care poate acționa la temperaturi între 95 şi 105^{0}C, suportând deci temperaturile de solubilizare a amidonului. Totodată, efortul pentru reducerea consumului de energie în unele ramuri de activitate ar putea pune în valoare enzimele bacteriilor *psihrofile.* Ele ar putea asigura operațiunile de spălare la temperaturi mai scăzute şi în condiții puternic alcaline. Un exemplu de acest fel este reprezentat de introducerea în

Scanned with OKEN Scanner

detergenţi a unei extremoenzime *(celulaza-103)*, extrasă dintr-o bacterie alcalofilă de către Societatea *Genencor International* din Rochester. Se preconizează de asemenea folosirea *xylanazelor* în procesul de înălbire a hârtiei, evitându-se astfel utilizarea compuşilor cu clor. De perspectivă apar aceste enzime şi pentru biosinteza unor molecule, prin capacitatea lor de a funcţiona cu randament superior în solvenţi neapoşi, (J. QUERELLOU et al. 1999).

3.2.1.Producerea de enzime prin cultivarea microorganismelor

Microorganismul producător de enzime trebuie bine cunoscut, selectat şi caracterizat taxonomic (pentru asigurarea reproductibilităţii procesului). Pentru folosirea lui în acest scop este necesar să i se elimine sau limiteze pe cât posibil unele însuşiri ca: sporularea, sinteza de antibiotice şi toxine, activităţile enzimatice nedorite etc. Izolarea unei tulpini microbiene producătoare a unei anumite enzime în cantităţi acceptabile şi lipsită de însuşirile menţionate anterior este o misiune migăloasă şi dificilă şi în acest proces este speculat fenomenul natural de mutaţie sau inducerea de mutaţii artificiale cu agenţi fizici şi chimici. Odată izolată o tulpină, trebuie urmărită şi îmbunătăţită stabilitatea ei genetică şi conservarea ei în condiţii adecvate (cel mai adesea prin liofilizare, sau prin păstrare în azot lichid) pentru a se evita degenerarea ei.

În practică cele mai utilizate sunt enzimele eliberate de microorganisme în mediul extracelular. În acest caz, preparatul enzimatic poate fi uşor separat de masa celulară, substanţele coloidale pot fi înlăturate cu ajutorul polielectroliţilor, iar prin filtrarea bacteriană a lichidului rezultat se obţine un preparat enzimatic standardizat, (IORDĂCHESCU şi DUMITRU, 1990). Pentru stabilizarea lui se pot adăuga: hidrolizate de amidon, alcooli ai zaharurilor, clorură de sodiu etc. În cazul enzimelor detergent, se obţin preparate enzimatice solide prin pulverizarea lichidului concentrat.

Dintre enzimele intracelulare prezintă importanţă economică şi se comercializează doar glucozo-izomeraza. Acest procedeu de obţinere a enzimelor este costisitor, deoarece implică distrugerea mecanică sau liza enzimatică a pereţilor celulari, procesul fiind şi mai greu de controlat.

Scanned with OKEN Scanner

Ca şi în cazul utilizării microorganismelor pentru obţinerea de proteine monocelulare şi în acest caz mediile de cultură (de fermentaţie) trebuie să îndeplinească o serie de condiţii (în general aceleaşi), ca:

- preţul lor de cost să fie scăzut;
- să fie accesibile şi în cantităţi mari;
- să prezinte o compoziţie chimică relativ constantă;
- să nu conţină substanţe toxice etc.

Mediile de cultură cele mai folosite se bazează pe hidrolizate de amidon, zer, făină din seminţe de soia sau bumbac, melasă, zaharoză, grâu, orz, porumb etc. Se stabilesc apoi compoziţia mediului de cultură pentru microorganismul cultivat şi condiţiile necesare pentru o producţie ridicată şi stabilă a enzimei dorite.

În cele mai frecvente cazuri, enzimele sunt produse în culturi submerse de microorganisme, în mediu aseptic, în bioreactoare sau fermentatoare de capacitate diferită, în care factorii de care depinde productivitatea (pH-ul, temperatura, cantitatea de oxigen etc) sunt strict controlaţi. Procesul fermentativ este controlat mai nou prin „electrozi enzimatici", care determină în fiecare moment nivelul anumitor metaboliţi din mediul de reacţie. Se folosesc frecvent procedeele de fermentaţie discontinuă, pentru că cele continue sunt mai dificil de controlat şi mai costisitoare. Un astfel de exemplu îl constituie producerea de *glucozo-izomerază* de către *Bacillus coagulans*. Durata fermentaţiei depinde de aportul de nutrienţi, condiţiile de cultivare şi de productivitatea microorganismului cultivat. În general, faza de creştere durează 12-24 ore, iar fermentaţia se termină după 50-150 ore, (IORDĂCHESCU şi DUMITRU, 1990). Unele enzime, ca pectinazele şi protează de *Aspergillus,* se produc pe un mediu de cultură semi-solid.

Pentru purificarea preparatelor enzimatice se folosesc diverse metode ca: precipitarea cu săruri neutre, precipitarea termică, precipitarea la pH ezoelectric, adsorbţia fracţionată, cromatografia de afinitate etc. Preparatele enzimatice comercializate trebuie să îndeplinească o serie de condiţii ca:

- să aibă capacitate catalitică stabilă;
- să fie uşor de utilizat;
- să nu conţină substanţe toxice sau microorganisme;
- să nu aibă gust;
- să fie rezistente la acţiunea unor microbi etc.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru folosirea lor în practică sunt testate mai întâi pe animale de experienţă în privinţa toxicităţii (orale sau cutanate), a capacităţii carcinogene sau teratogene etc, teste care por dura mai mulţi ani.

Preparatele enzimatice de origine microbiană se folosesc mai ales în procesele industriale (industria alimentară, chimică, de pielărie, în instalaţiile de epurare şi protecţie a mediului). În industria medico-farmaceutică sunt utilizate mai ales enzimele de origine animală şi vegetală, pentru că trebuie să se ţină cont de proprietăţile lor imunologice şi specificitatea lor de acţiune. Astfel, pepsina se obţine din sucul gastric sau mucoasa gastrică a unor animale prin precipitare cu sulfat de amoniu. Precipitatul se separă prin centrifugare, se tratează cu HCl diluat pentru activarea pepsinogenului, după care supernatantul se tratează cu acetonă, se colectează din nou precipitatul, care se dizolvă cu HCl diluat, se adaugă $MgSO_4$ până la saturaţie, precipitatul fiind pepsina activă ce poate fi utilizată în hidroliza proteinelor sau ca medicament, (IORDĂCHESCU şi DUMITRU, 1990). O altă enzimă de origine animală, *carboxipeptidaza*, se obţine din pancreasul congelat al animalelor, prin tratare cu CH_3COOH, (5N).

Enzimele provenite din ţesuturile animale au un preţ de cost ridicat şi se obţin în cantităţi mici. În acest caz apar dificultăţi datorate şi heterogenităţii surselor biologice (condiţionate de vârstă, boli, contaminarea cu anumite microorganisme etc). Nici obţinerea lor în culturi de ţesuturi şi celule animale nu pare a fi în momentul de faţă o alternativă, deoarece ele reclamă prezenţa serului în mediul de cultură, care creşte posibilitatea contaminării microbiene şi face dificilă recuperarea enzimelor din mediul de cultură.

3.2.2. Unele enzime microbiene şi utilizarea lor

În cele mai multe procese biotehnologice sunt larg folosite, aşa cum s-a precizat, enzimele de origine microbiană. În tabelul 3.3 prezentăm câteva dintre cele mai utilizate enzime microbiene, dintre care vom detalia în continuare pe unele din ele.

Amilazele intervin în hidroliza amidonului.

Alfa-amilaza transformă amidonul în *dextrine* şi *maltoză*. Ea este produsă de unele mucegaiuri ca: *Rhizopus delemar*, *Aspergillus oryzae*, *A. niger* şi bacterii ca: *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, *Pseudomonas saccharophila*, *Clostridium sp.*

Scanned with OKEN Scanner

Glucoamilaza sau *amiloglucozidaza* scindează amidonul la glucoză şi se obţine din unele mucegaiuri ca: *Aspergillus niger, A. phoenices, A. awamori, Endomyces sp.*

Ambele enzime intră în categoria celor extracelulare. Pentru obţinerea lor se folosesc medii nutritive adecvate, care conţin indicatori ai biosintezei enzimelor amilolitice (amidon, melasă, glicogen, zaharoză etc), o sursă de azot (hidrolizate proteice, uree, azotat de sodiu, acid aspartic etc, tabelul 3.4). Cultivarea se poate face pe plăci, submers sau prin metoda cu tambur rotativ, respectându-se anumite condiţii de pH, temperatură, aerare etc, (fig. 3.3) După terminarea timpului de fermentaţie se separă biomasa de lichidul de cultură, iar extracţia enzimelor din acesta se poate face prin precipitare cu alcool izopropilic în cazul ∝-amilazei şi cu acetonă în cazul amiloglucozidazei. Precipitatul se separă prin centrifugare, se purifică şi se standardizează.

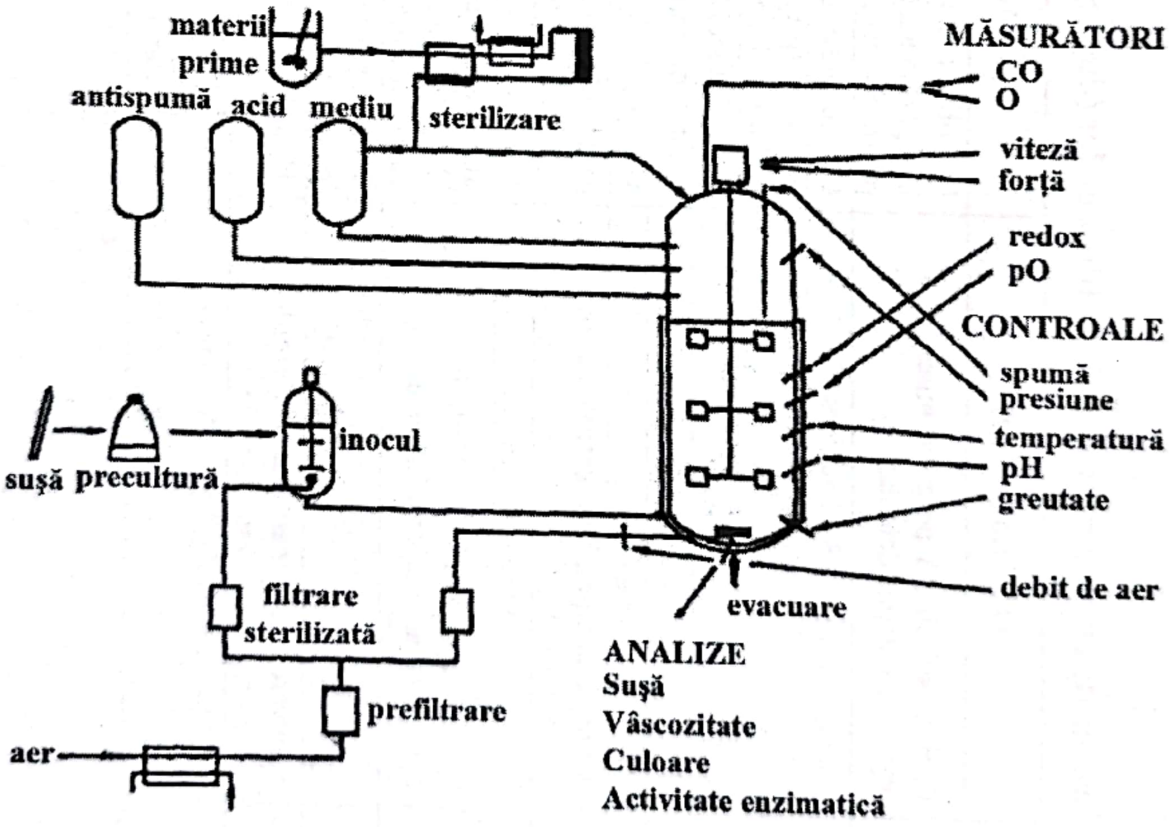


Fig. 3.3. Schema unei instalaţii de fermentare pentru producerea enzimelor (după K. AUNSDRUP)

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3.3. Enzime de origine microbiană şi utilizarea lor (după SASSON, 1988; NIMIŢAN, 1992)

Nr. crt.	Enzima	Originea (specia)	Acţiune specifică, domenii de utilizare
1.	Amilaze	Bacillus subtilis, Aspergillus niger, A. oryzae, Rhizopus delemar	Hidroliza amidonului în dextrine, maltoză şi glucoză; îndepărtarea amidonului; zaharificarea substanţelor amilacee pentru fermentare alcoolică; clarificarea sucurilor de fructe
2.	Amiloglicozidază	Aspergillus niger, A.phoenices, A.awamori, Endomycopsis sp.	Obţinerea siropului de glucoză şi a glucozei cristalizate; obţinerea siropului de glucoză şi fructotă; zaharificarea amidonului, accelerarea fermentării mustului
3.	Glucozo-izomerază	Bacillus sp., Streptomyces olivochromogenes	Hidroliza amidonului şi obţinerea siropurilor de fructoză din amidon de porumb
4.	α-galactozidază	Mortierella vinaceae	Hidroliza rafinozei din melasă
5.	B-galactozidază (lactază)	Aspergillus niger, Kluyveromyces fragilis, Mucor pussillus	Hidroliza lactozei pentru prevenirea cristalizării ei; creşterea cantităţii de zahăr în aluat prin adăugarea de lapte, zer, lactoză
6.	Dextranzaharază	Leuconostoc mesenteroides	Obţinerea dextranilor pentru medicină şi industria alimentară
7.	Glucozoxidază	Corynebacterium sp., Penicillium chrysogenum, Aspergillus niger	Înlăturarea oxigenului şi asepsia alimentelor; fabricarea prafului de ou (eliminarea glucozei); fabricarea δ-lactonei, adjuvant la fabricarea preparatelor de carne
8.	Invertază	Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus niger	Producerea zahărului invertit din zaharază; obţinerea mierii artificiale şi a bomboanelor glazurate
9.	Inulază	Kluyveromyces marxinus, Aspergillus niger	Hidroliza inulinei la fructoză

Scanned with OKEN Scanner

10.	Proteaze	Bacillus subtilis, B. licheniformis, Aspergillus sp., Saccharomyces cerevisiae	Liza proteinelor de origine vegetală şi animală; prepararea brânzeturilor; fabricarea sosului de soia şi condimentelor pe bază de aminoacizi; prelucrarea pieilor; activarea digestiei; frăgezirea cărnii, eliminarea proteinelor din băuturile de fermentaţie
11.	Cheag fungic (renină)	Endothia parasitica, Mucor pussillus, M. miehei	Înlocuirea cheagului animal în industria de brânzeturi
12.	Pectinaze	Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Clostridium felsincum	Limpezirea sucului de fructe şi a vinului; obţinerea sucurilor concentrate; creşterea randamentului în sucuri la presare
13.	Celulază	Tricoderma reesi	Hidroliza celulozei la glucoză
14.	Lipaze	Saccharomyces lipolytica, Bacillus sp., Candida sp., Geotrichum candidum	Fabricarea untului şi gliceridelor; activarea digestiei; îmbunătăţirea calităţii făinurilor; maturarea brânzeturilor şi formarea aromelor
15.	Nitrat-reductază	Bacillus subtilis	Reducerea cantităţii de nitril şi îmbunătăţirea culorii cărnii în industria preparatelor din carne
16.	Uricază	Drojdii, Streptomyces sp.	Descompunerea acidului uric
17.	Aspartază şi fumarază	Bacillus sp.	Producerea de acid aspartic şi malic din acid fumaric

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3.4. Formele de medii nutritive pentru producerea de unor enzime microbiene

Componente	g/litru
a. Proteaza din *Bacillus*	
Hidrolizat de amidon	150,0
Lactoză	4,3
Făină de bumbac	30,0
Drojdie de bere	7,2
Proteină de soia	3,7
K_2HPO_4	4,3
$MgSO_4$	1,3
b. Amilaza din *Bacillus*	
Amidon de cartof	100
Crupe de orez	50
Făină de soia	20
Caseinat de sodiu	10
$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$	9
c. Amilaza fungică	
Amidon de porumb	24,0
Macerat de porumb	36,0
NaH_2PO_4	47,0
$CaCl_2$	1,0
KCl	0,2
$MgCl_2 \times 6H_2O$	0,2
d. Glucoamilaza	
Amidon de porumb	150
Macerat de porumb	10

Amilazele microbiene se folosesc: la producerea siropului de amidon din porumb, care are un conținut ridicat de glucoză, necesar la prepararea produselor zaharoase); la fabricarea dextrinelor (utile în industria alimentară şi textilă; la obținerea glucozei (larg utilizată în industria alimentară şi farmaceutică); la limpezirea sucurilor de fructe (care sunt opalescente din cauza prezenței amidonului) şi prepararea jeleurilor; în producerea berii şi alcoolului; în industria de panificație pentru creşterea activității distazice a făinurilor etc.

Glucozo-izomeraza intervine în transformarea glucozei în fructoză, cu obținerea de fructoză cristalizată şi se produce prin cultivarea pe xiloză a unor actinomicete ca: *Streptomyces venezuelae, S. albus, S. olivochromogenes*. Ca materie primă sunt folosite zahărul şi

Scanned with OKEN Scanner

glucoza. Folosirea concomitentă a ∝-milazei, amiloglucozidazei şi gluco-izomerazei asigură obţinerea din amidon (cu randament ridicat) a zaharurilor fermentescibile.

Dextran-zaharaza şi dextranaza se folosesc în obţinerea *dextranului* şi respectiv la depolimerizarea lui uşoară. Dextran-zaharaza asigură transferul grupării *glucozil* din zaharoză la glucoză sau maltoză, cu eliberarea fructozei. Ataşarea progresivă de radicali glucozil duce la creşterea moleculei de dextran. Enzima este produsă extracelular prin cultivarea bacteriei L*euconostoc mesenteroides* pe mediu cu zaharoză (cca 2-3%) şi extract de porumb (2%), la temperatura de 25^0C şi pH=7,4.

Dextranaza hidrolizează legăturile ∝-1,6-glucozidice din polizaharide ca dextranul şi se foloseşte la depolimerizarea dextranului nativ până la greutatea moleculară de cca 75.000, pentru a fi folosit în prepararea soluţiilor înlocuitoare de plasmă. Enzima se obţine prin cultivarea pe un mediu cu dextran a unor mucegaiuri ca: *Penicillium funiculosum, P. lilacinum, P. luteum, Aspergillus wenti etc,* (NEMIŢAN, 1992).

Glucoz-oxidaza asigură transformarea glucozei în *acid gluconic* şi *apă oxigenată* în prezenţa oxigenului, iar *catalaza* descompune apoi apa oxigenată care se formează. Enzima este produsă prin cultivarea unor mucegaiuri ca: *Penicillium chrysogenum* şi P. *notatum* şi este folosită la protecţia unor alimente contra degradării prin oxidare, sau la determinarea cantitativă a glucozei.

*Invertaza (*sau *β-h-fructozidaza*) transformă glucoza din zahăr în fructoză şi se foloseşte la producerea zahărului invertit. Invertaza se obţine prin cultivarea unor drojdii ca: *Saccharomyces cerevisiae* şi *S. uvorum* pe medii de cultură ce conţin zaharoză sau melasă. Enzima se produce intracelular şi este legată de peretele celular. Eliberarea enzimei se face prin autoliză celulară şi precipitarea ei cu alcool etilic sau acetat de plumb, sau prin hidroliza enzimatică a pereţilor celulari cu *Actinomyces cellulose*. Zahărul invertit este mai solubil decât zaharoza şi cristalizează mult mai greu şi de aceea este folosit la producerea soluţiilor foarte concentrate de zahăr (cca 72%) pentru fabricarea de produse zaharoase, îngheţată, lichioruri, bomboane glazurate.

Lactaza (β-galactozidaza) scindează *lactoza* în galactoză şi glucoză. Pentru obţinerea lactazei se cultivă drojdii: *Sccharomyces fragilis, S. lactis, Candida sferica, C. utilis, C. pseudotropicalis* pe mediu

Scanned with OKEN Scanner

de cultură cu zer şi adaos de sulfat de amoniu. Enzima se foloseşte la prepararea unor produse de patiserie (bomboane, înghețată etc), la prevenirea cristralizării lactozei din componența acestora şi la eliminarea lactozei din produsele dietetice pentru persoanele care nu tolerează acest glucid.

Pectinazele sunt enzime care produc degradarea *pectinei* şi sunt sintetizate de bacterii ca: *Bacillus subtilis, B. carotovorus, B. mesentericus, Clostridium acetoethylicum, Pseudomonas marginalis* şi de mucegaiuri din genurile: *Aspergillus, Rhizopus, Penicillium, Mucor.* Ca substrat pentru cultivarea acestor microorganisme se foloseşte frecvent melasa din sfecla de zahăr. Pectinazele sunt utilizate la limpezirea sucurilor din fructe, la accelerarea procesului de fermentație şi de învechire a vinurilor, la hidroliza substanțelor pectice în procesul de topire a inului.

Proteazele au o mare diversitate şi capacitatea de a scinda legăturile peptidice (CO-NH) din moleculele de proteine şi polipeptide până la aminoacizi. Capacitatea de sinteză a proteazelor este specifică unor bacterii ca: *Bacillus subtilis, B. megatherium, Clostridium sporogenes, Proteus vulgaris, Pseudomonas sp.* şi a unor mucegaiuri ca: *Asperillus niger, A. oryzae, A. terricola, Penicillium lilacinum etc.* Pentru obținerea proteazelor din *Bacillus subtilis* se cultivă bacteria pe un mediu constituit din melasă, amidon sau glucoză la pH = 7 şi temperatura de 37^{0}C. La această specie prezintă interes proteaza alcalină (pH optim cca 10,5), care are o stabilitate ridicată. Se obțin proteaze şi prin cultivarea speciei *Aspergillus niger* pe medii cu amidon, melasă, zaharoză, glucoză, la o temperatură de 30 – 40^{0}C şi o bună aerare. Proteazele provenite din mucegaiuri acționează în limite largi de pH (de la 3,5 la 9,0). Proteazele sunt folosite în industria cărnii (pentru frăgezire), în tăbăcirea pieilor, la obținerea mătăsii artificiale (prin degradarea *sericinei),* în industria detergenților (pentru îndepărtarea petelor de natură proteică de pe țesuturi), în medicină, la obținerea hidrolizatelor proteice, în industria cauciucului natural etc.

Scanned with OKEN Scanner

3.2.3. Metode utilizate pentru stabilizarea preparatelor enzimatice

O condiție importantă pentru utilizarea în practică a biopreparatelor enzimatice obținute prin procese biotehnologice este, în afara prețului de cost, stabilitatea lor.

Una din metodele care pot contribui la stabilizarea enzimelor este simpla utilizare a unor săruri ca: Na_2SO_4, NaCl, KCl, care determină o precipitare reversibilă a proteinei (enzimei), acțiune care o ferește de denaturare (depliere) la temperaturi ridicate.

O altă metodă de stabilizare o reprezintă includerea enzimelor în micele de agenți tensioactivi. S-a constatat că o serie de agenți tensioactivi formează în prezența solvenților organici micele „inverse", în care grupările hidrofobe se dispun la exterior, iar cele polare (ionice) la interior. Aceste micele „inverse" pot lega cantități mari de apă (la o moleculă de detergent, de exemplu, se pot lega câteva zeci de molecule de apă) și solubiliza compuși organici polari. Prin preluarea enzimei de către micela „inversă" (fig. 3.4) ea va fi protejată de denaturare, întrucât molecula de proteină și faza organică este stabilizată de moleculele detergentului. Agenții tensioactivi exercită un puternic efect stabilizator asupra enzimelor.

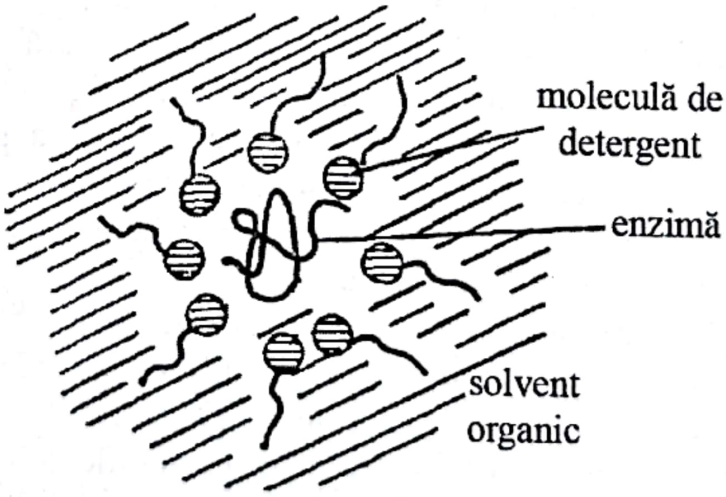


Fig. 3.4. Încorporarea enzimei în micela "inversă" a unui detergent într-un solvent organic (după IORDĂCHESCU și DUMITRU, 1990)

Scanned with OKEN Scanner

Unele modificări chimice provocate de agenţi care au mase moleculare mici pot de asemenea contribui la stabilizarea preparatelor enzimatice. Astfel, prin acetilarea α-amilazei, ea devine termostabilă la temperaturi de peste 70^0C. Alkilarea şi acilarea grupărilor amino ale α-chimotripsinei asigură o creştere evidentă a termostabilităţii ei. Diversele enzime au grupări funcţionale diferite la un anumit agent, ale căror modificare pot să provoace termostabilizarea.

O altă modalitate de stabilizare a enzimelor este *înreţelarea intramoleculară* cu reactivi bifuncţionali. O astfel de metodă a inventat însăşi natura, prin stabilirea de punţi disulfidice. În practică se foloseşte înreţelarea unor enzime (*lactat-dehidrogeneza, glucozoxidaza)* prin tratamentul cu glutaraldehidă. În termostabilizarea enzimelor s-au mai testat reactivi bifuncţionali ca: diimidoesterii, diizocianaţii, sărurile de bisdiazoniu. Metoda este însă mai puţin practicată din cauza dificultăţilor în sinteza reactivilor bifuncţionali şi deci a accesibilităţii lor (IORDĂCHESCU şi DUMITRU, 1990).

Cea mai bună tehnică de stabilizare a enzimelor este însă imobilizarea lor pe diverse suporturi.

3.2.4. Imobilizarea enzimelor

Imobilizarea enzimelor reprezintă fenomenul prin care se realizează includerea lor într-o reţea moleculară (înreţelare intramoleculară) cu ajutorul unor reactivi bifuncţionali, sau fixarea lor covalentă la un anumit suport. Imobilizarea enzimelor a plecat de la constatarea că cel mai adesea în celulele vii enzimele sunt legate de sistemul de membrane celulare. Imobilizarea are o serie de avantaje ca:

- asigură utilizarea repetată a enzimelor;
- permite păstrarea activităţi şi stabilităţii enzimelor;
- procesul poate fi controlat şi deplasat spre valorile optime ale pH-lui şi temperaturii de acţiune ale enzimelor;
- permite automatizarea procesului în instalaţiile semicontinue şi continue;
- asigură o viteză de reacţie sporită;
- transformarea produsului poate fi stopată la momentul dorit;
- se obţin produşi cu puritate ridicată, care pot fi uşor de recuperat;
- se pot folosi cu randament bun soluţii diluate de substrat (ape industriale, subproduse etc);

Scanned with OKEN Scanner

- sistemul asigură eliminarea fazei de inactivare a enzimelor în condiții neadecvate de temperatură, pH, în prezența solvenților organici etc;
- modificările denaturante pot fi prevenite dacă se „fixează" artificial conformația centrului catalitic activ etc.

Imobilizarea poate influența activitatea enzimatică, funcție de pH-ul mediului, temperatură, prezența în mediu a unor agenți denaturați etc. Controlul procesului biotehnologic în care sunt utilizate preparatele enzimatice imobilizate poate fi exercitat prin tipul de bioreactor folosit, modificarea condițiilor de lucru, a timpului de retenție etc.

Imobilizarea enzimelor poate fi realizată prin legarea lor la un anumit suport (*adsorbție, legare ionică, legare covalentă, chelare* prin metale), prin includerea lor în geluri, fibre, capsule (*microîncapsulare*) şi prin *coreticulare*. Complexul enzimă-suport trebuie să păstreze activitatea catalitică. Este necesar ca suportul să conserve proprietățile enzimei (să nu denatureze enzima), să fie hidrofil şi rezistent la modificările de temperatură şi pH. Deşi este dificil de stabilit condițiile de lucru (pH, temperatură) se pot imobiliza chiar mai multe enzime într-o matrice, procedeu menit să asigure realizarea reacțiilor dintr-un lanț metabolic.

3.2.4.1. Metode de imobilizare a preparatelor enzimatice

Adsorbția reprezintă legarea reversibilă a unei enzime, în urma interacțiunilor fizice şi ionice, la un suport ca: silicagelul, sticla, materialele ceramice, răşinile organice, oxizii şi hidroxizii unor metale, polizaharidele etc. Ca suporturi adsorbante anorganice se folosesc frecvent fosfatul de calciu, cărbunele activ, hidroxilapatita, celuloza, sticla, argila, colodiul; ca suporturi organice: celuloza, amidonul, dextranii, colagenul, albumina, agaroza, chitina; ca suporturi sintetice: unii polimeri ca polistirenul, nylonul, poliamidele etc. Creşterea gradului de adsorbție poate fi realizată prin introducerea la suprafața enzimei (proteinei) a unor grupări ionice sau hidrofobe suplimentare.

Legarea ionică este o metodă de adsorbție care recurge la imobilizarea enzimelor cu ajutorul unor schimbători anionici (DEAE-celuloza, Dowex-2) sau cationici (CM-celuloza, citrat-celuloza, fosfat-celuloza, Dowex-50) şi se bazează pe caracterul poliectrolitic şi amfoter al proteinelor. Cantitatea de enzimă legată de suport depinde de

Scanned with OKEN Scanner

concentrația ei în mediul de adsorbție, pH-ul mediului, temperatura de reacție, forța ionică a mediului, dimensiunile particulelor și natura suportului etc.

Ambele metode de imobilizare sunt ușor de realizat, pot asigura desorbția enzimei prin stimularea condițiilor de sorbție. Au dezavantajul că enzima se disociază ușor din complexul suport-enzimă. Adsorbția are loc doar superficial și de aceea enzimele imobilizate astfel au o activitate specifică relativ scăzută.

Legarea covalentă asigură imobilizarea unei enzime printr-o reacție chimică între grupările reactive ale enzimei și ale suportului. Prin medierea unor grupări de tip azidă, imidocarbonat, oxiran, izotiocianat, diazo-triazinil etc, se asigură legarea enzimelor la suporturi organice (materiale ceramice, sticlă poroasă) sau la polimeri de sinteză (nylon, poliacrilamidă, polistiren). Uneori suportul trebuie activat pentru a-i mări capacitatea de legare la suprafața lui. Imobilizarea enzimelor prin legături covalente are unele avantaje ca: asigură o mai mare trăinicie a legăturii enzimă-suport, pierderile de enzimă în mediu sunt mici, asigură o rezistență crescută a enzimei la factorii de denaturare. Ca inconvenient a fost semnalat faptul că în timpul fixării enzimei pot avea loc modificări ale structurii ei tridimensionale care-i determină o inactivare parțială.

Legarea încrucișată se realizează frecvent cu ajutorul glutaraldehidelor și acidului bis-diazobenzidin-2,2′-disulfonic și constă în formarea de legături covalente încrucișate între catenele enzimei și ale suportului. Agenții de legare au două sau mai multe grupări funcționale reactive, astfel realizându-se legarea intermoleculară încrucișată.

Includerea enzimelor. Enzimele pot fi reținute în rețeaua tridimensională a unui polimer insolubil în apă sau pot fi incluse în microcapsule delimitate de o membrană semipermeabilă, a cărei pori permit transportul substratului și produșilor de reacție, dar împiedică trecerea (evadarea) enzimelor.

Includerea enzimei într-un gel presupune fixarea ei în spațiile interstițiale ale unui polimer insolubil în apă. Enzima este dispersată sau solubilizată într-o soluție sau emulsie de monomeri, iar prin polimerizarea acestora se va forma o rețea care va imobiliza la mijloc enzima. Această modalitate de imobilizare trebuie să stabilească un raport optim între monomeri și agentul de reticulare, astfel încât să nu fie

Scanned with OKEN Scanner

împiedicat nici accesul substratului la centrii activi ai enzimei, dar nici să permită eluarea (evadarea) enzimei prin ochiurile rețelei.

Enzimele pot fi incluse în poliacrilamidă, caz în care enzima se amestecă într-o soluție de monomeri de acrilamidă, în prezența N, N'-metilen-bis-acrilamidei și a unui agent de reticulare. Reacția de polimerizare se realizează cu ajutorul persulfatului de potasiu, a riboflavinei (fotopolimerizare), iar mai recent cu ajutorul iradieii X sau gamma. Inițierea polimerizării monomerilor de acrilamidă prin iradiere are avantajul că evită inactivarea enzimelor (posibilă cu agenți chimici). Imobilizarea prin includerea în geluri de pliacrilamidă este un procedeu destul de larg folosit în procesele industriale și semiindustriale. Exemplele de enzime imobilizate prin acest procedeu: glucozoxidaza (pentru producerea de acid gluconic), glucoamilaza (pentru obținerea glucozei din amidon), aspartaza (pentru producerea de acid α-aspartic), alcooldehidrogenaza (pentru dehidrogenarea alcoolului), glucozizomeraza (pentru obținerea siropurilor fructozice). Această metodă de includere este relativ simplă, dar are ca inconvenient toxicitatea monomerilor.

Preparatele enzimatice pot fi imobilizate și cu ajutorul *alginaților*, care sunt poliozizi ce formează soluții vâscoase în prezența cationilor monovalenți (Na^{+}, de exemplu) și geluri în prezența cationilor bivalenți (Ca^{++}, de exemplu). Ele pot fi de asemenea sechestrate în microcavități de fibre sintetice, cum ar fi de exemplu fibrele de *poliacetat de celuloză*, fibre rezistente la acizi slabi, baze, anumiți solvenți organici, forțe ionice crescute etc.

Enzimele pot fi incluse și în *microcapsule* formate din membrane polimerice semipermeabile, care nu permit difuzia enzimei în exterior și a compușilor macromoleculari în interior, dar permit circulația liberă a substratului enzimei și a produsului ei de reacție (compuși cu masă moleculară mică). Pentru microîncapsularea enzimei se folosesc polimeri naturali și sintetici. Microcapsulele sintetice se pot obține prin polimerizare interfazică, coacervare interfazică și dublă emulsionare. Fără a intra în detalii, vom spune că polimerii sintetici folosiți la microîncapsulare sunt constituiți din poliamide, poliuretani, polistiren, poliuree, nitrați de celuloză, etil-celuloză, clor-cauciuc etc.

Microîncapsularea naturală a enzimelor apelează frecvent la folosirea *liposomilor* și *fantomelor eritrocitare*. Liposomii sunt vezicule constituite din fosfolipide. Liposomii și fantomele eritrocitare pot fi

Scanned with OKEN Scanner

folosite în scop terapeutic pentru vehicularea anumitor enzime în organism, în cazul unor boli în care lipsesc unele enzime sau ele au o activitate scăzută. Avantajul acestei metode constă în faptul că liposomii şi fantomele eritrocitare pot vehicula enzimele odată cu fluxul sanguin la toate organele şi ţesuturile şi nu dau fenomene de respingere. Se fac încercări de a se folosi în acelaşi scop leucocitele şi hepatocitele.

Metodele de includere a enzimelor au avantajul că într-un volum mic se obţine o suprafaţă mare de contact între enzimă şi substratul ei, că pot fi imobilizate simultan mai multe enzime care reclamă condiţii de reacţie asemănătoare. Dezavantajele lor sunt reprezentate de faptul că pot fi aplicate doar în reacţiile ce implică substrate cu masă moleculară mică şi că (frecvent) ele nu pot împiedica o anumită pierdere de enzime în efluent.

În sfârşit, o altă metodă de imobilizare a enzimelor recurge la *polimerizarea* moleculelor acestora în prezenţa unui anumit agent şi obţinerea unui produs cu masă moleculară mare şi solubilitate scăzută. Astfel, prin adăugarea unei cantităţi mici de NaCl la o soluţie alcoolică (30%) de urează se stabilesc o serie de legături disulfidice intermoleculare şi se obţine ureaza insolubilizată. În cazul chimotripsinei, prin folosirea N-etil-5-fenilizoxazolin-3′-sulfonatul, s-a obţinut polichimotripsina etc.

În figura 3.5 sunt redate schematic unele modalităţi de imobilizare a enzimelor, (după IORDĂCHESCU şi DUMITRU, 1990).

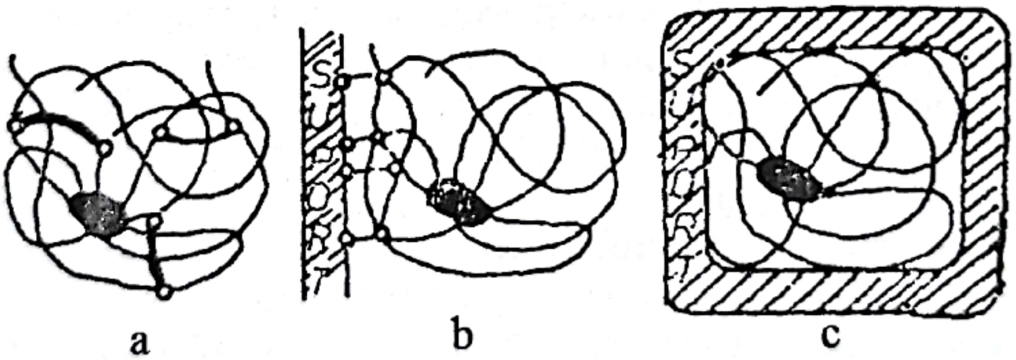


Fig. 3.5. Posibilităţi de fixare a enzimelor (după IORDĂCHESCU şi DUMITRU, 1990)

a - înreţelare intramoleculară; b - legare covalentă sau necovalentă la un suport; c - includerea mecanică a unei enzime în porii unui suport inert

Scanned with OKEN Scanner

Enzimele imobilizate sunt utilizate în procese biotehnologice foarte variate, cum ar fi: hidroliza unor substanțe (amidon, zaharoză, proteine, peptide etc), în sintezele organice la grefarea anumitor grupări funcționale, în analizele chimice calitative și cantitative, la decelarea unor pesticide care le determină inactivarea, la realizarea unor medicamente cu acțiune prelungită și toxicitate scăzută, la obținerea de biodetergenți (care conțin amilază, lipază și proteaze insolubilizate), la separarea inhibitorilor enzimatici etc.

3.2.4.2. Utilizarea enzimelor imobilizate

Unul din domeniile care a beneficiat mult de pe urma acestor tehnici este industria alimentară. Ele au permis dezvoltarea unor biotehnologii în flux continuu.

Se știe, de exemplu, că fructoza este un zahăr mai puțin dăunător în alimentația omului decât zahărul, deoarece metabolizarea ei nu depinde de nivelul insulinei în organism și deci poate fi folosită în consum și de către diabetici. Totodată, fructoza este mai dulce decât zahărul (cu 60-70%), are un gust mai plăcut (de miere de albine), iar faptul că în combinație cu glucoza nu zaharifică o face utilă în cofetărie. Având în vedere aceste avantaje, se folosește glucoizomeraza imobilizată în transformarea glucozei în fructoză până cele două hexoze ajung la concentrații egale și se obține un sirop de glucoză-fructoză. Acesta poate fi folosit ca atare, sau se separă fructoza din el și glucoza se supune unui nou ciclu de izomerizare. Procedeul industrial practicat de firma americană Clinton Corn folosește ca materie primă hidrolizatul de amidon din porumb sau cartof supus acțiunii enzimei imobilizate (sub formă de granule, fibre sau gel) într-o coloană (fermentator) de mare capacitate. Enzima se schimbă la interval de cca 2-3 luni, de aceea procedeul este mult mai rentabil decât prin utilizarea enzimei solubile.

Amidonul este cel mai important glucid de rezervă în plante, printre cele mai bogate în acest produs fiind cartoful, porumbul, grâul, orezul, maniocul. El reprezintă o materie primă larg utilizată în industria alimentară. Prin hidroliza parțială a amidonului se pot obține *maltodextrine* (folosite ca aliment dietetic), precum și siropuri de glucoză (bogate în maltoză) folosite în cofetărie, în industria băuturilor dulci, a biscuiților etc, iar prin hidroliza lui totală se obține glucoza, care este utilizată în industria băuturilor, industria farmaceutică etc. Prin

Scanned with OKEN Scanner

hidrogenarea enzimatică a glucozei se obține *sorbitolul*, care are numeroase utilizări. Transformarea amidonului în diverşi derivați se realizează cu enzime specifice de origine microbiană, ca α- şi β-amilaza, amilo-glucozidaza, glucozo-izomeraza. Invertirea zahărului în sirop de glucoză-fructoză se realizează cu ajutorul invertazei imobilizate, produsă de drojdii (*Saccharomyces cerevisiae, S. carlsbergensis*).

Obținerea din amidon a siropurilor dulci a cunoscut o mare dezvoltare după al doilea război mondial, când s-a constatat că amidonul poate fi dezagregat nu numai prin hidroliză acidă, ci şi cu ajutorul unor enzime fungice. Un progres important în acest sens l-a constituit izolarea α-amilazei termostabile din *Bacillus licheniformis*, care poate fi utilizată până la temperatura de 110^{0}C. Prin asocierea α-amilazei cu amiloglucozidaza se obțin siropuri care conțin până la 92-96% glucoză. Din păcate nu s-a putut elabora un procedeu de asociere a celor două enzime în acelaşi reactor, deoarece pH-ul şi temperatura lor optimă de reacție diferă mult. De aceea, după hidroliza amidonului cu α-amilază, se foloseşte amiloglucozidaza imobilizată pentru producerea siropului de glucoză. În funcție de conținutul lor în fructoză, siropurile din prima generație au un conținut de cca 42% fructoză, cele din generația a doua de 55%, iar cele din generația a treia de 97% fructoză. Aceste siropuri au o capacitate de îndulcire superioară zahărului şi sunt mult folosite pe piața de alimente, având capacitate calorică mai mică.

Enzimele imobilizate şi-au găsit utilizarea şi în producerea de L-aminoacizi, formă sub care sunt asimilați ei de organismul uman (cu excepția metioninei). Separarea L-aminoacizilor din amestecurile DL se poate realiza cu ajutorul enzimei *amiloacilaza,* care este adsorbită într-o coloană (pe răşină) şi prin coloană se trec aminoacizii sintetizați chimic.

Folosind ca materie primă acidul fumaric şi amoniacul, cu ajutorul *aspartazei* se obține *L-aspartatul*, mult utilizat în prepararea de siropuri şi produse de cofetărie. Din acidul fumaric, folosind *fumaraza* imobilizată sau celule de *Escherichia coli* imobilizate pe geluri de poliacrilamidă sau carragenan (polizaharid provenit dintr-o algă marină) se obține acidul L-malic, utilizat ca înlocuitor de acid citric în industria alimentară şi farmaceutică.

Prelucrarea laptelui cu *β-galactozidază (lactază)* imobilizată asigură obținerea aşa-zisului lapte dietetic, lipsit de lactoză (principalul glucid din lapte). Din cauza lactozei unele persoane (care suferă de

Scanned with OKEN Scanner

galactozemie) nu pot consuma lapte. Enzima scindează lactoza la glucoză şi galactoză, laptele prelucrat fiind mai dulce decât cel natural, datorită glucozei. Cu ajutorul lactazei imobilizate se obţine glucoză şi din lactoza prezentă în zer, care glucoză se foloseşte apoi în industria alimentară şi farmaceutică.

Prin utilizarea proteazelor imobilizate se obţin din unele reziduuri de natură proteică ale industriei alimentare hidrolizate proteice, care sunt administrate în hrana oamenilor supuşi la eforturi fizice şi psihice mari. Enzimele proteolitice extrase din bacterii şi fungi sunt utilizate la prelucrarea pieilor şi în industria de detergenţi.

Enzimele imobilizate şi-au găsit utilitatea şi în elaborarea de metode analitice pentru dozarea rapidă, cu mare acurateţe şi la un preţ de cost foarte scăzut, a unor substanţe din amestecuri complexe. Aşa, de exemplu, prin folosirea glucozoxidazei sau glucozodehidrogenazei se poate măsura nivelul glucozei în sânge şi prin dozări repetate ale acestuia se poate urmări efectul unui tratament adecvat diabeticilor.

Pentru dozarea unor compuşi s-au conceput şi realizat aşa-zişii *electrozi enzimatici*, bacterieni şi tisulari (un fel de membrane enzimatice). Electrozii enzimatici se prepară prin imobilizarea enzimelor ca, straturi biocatalitice, pe electrozi ion-selectivi (IORDĂCHESCU şi DUMITRU, 1990). Mecanismul lor de acţiune constă în măsurarea diferenţei de potenţial dintre un electrod de referinţă (cu potenţial constant) şi un electrod de membrană biocatalitic, reprezentat de un electrod de ioni selectivi. Se foloseşte o membrană senzor pe care se depune enzima solubilă sau imobilizată, bacterii sau ţesuturi, substratul utilizat difuzând în spaţiul biocatalitic, unde are loc reacţia specifică - cu formarea unuia (sau unor) compus(i) reactiv(i) electrochimic, care poate fi determinat amperometric sau potenţiometric. Un astfel de electrod (AMP selectiv) poate, de exemplu, să diferenţieze AMP legat de cel liber, prin măsurarea reacţiei între AMP şi fructozo-1,6-difosfatază.

Deoarece electrozii enzimatici sunt costisitori, s-a recurs la imobilizarea bacteriilor sau ţesuturilor pe electrozi ion-selectivi. De exemplu, pentru dozarea L-aspartatului se obţine un electrod bacterian cu *Bacterium cadaveris* (pentru enzima *L-aspartat-dezaminaza*). În cazul electrodului tisular, în locul enzimelor şi bacteriilor imobilizate, se folosesc ţesuturi imobilizate. Pentru dozarea adenozinei, de exemplu, s-a

Scanned with OKEN Scanner

utilizat ca electrod ţesut intestinal de şoarece, care conţine o cantitate mare de *adenozin-dezaminază*.

S-au elaborat de asemenea tehnici de analiză imuno-enzimatice, în care anticorpul serveşte ca detector al unei anumite substanţe, iar enzima joacă rolul de marker al reacţiei imunologice (cu ajutorul ei vizualizându-se formarea complexului antigen-anticorp).

Enzimele imobilizate sunt utilizate şi în sintezele organice, în vederea obţinerii unor compuşi de mare interes economic, Aşa de exemplu, prin folosirea *penicilin-amidazei* imobilizate este scindată penicilina microbiană iniţială, cu obţinerea acidului 6-aminopenicilanic, produs cheie în semisinteza altor peniciline. Cu ajutorul aceleiaşi enzime s-a obţinut acidul 7-amino-dezacetoxi-cefalosporic, produs cheie în sinteza de cefalosporine noi.

Separarea amestecurilor racemice de aminoacizi şi obţinerea aminoacizilor optic-activi în stare pură este de asemenea o problemă de mare actualitate în biotehnologie, care nu poate fi rezolvată eficient prin metode chimice. Amestecurile racemice ale aminoacizilor N-acilaţi sunt hidrolizate cu *aminoacid-acilază*, enzimă care scindează mult mai rapid (de cca 10 mii de ori) derivaţii enantiomerilor levo- decât pe cei dextro-N-acilaţi, (IORDĂNESCU şi DUMITRU, 1990). Folosirea acilazelor asigură separarea amestecurilor racemice ale majorităţii aminoacizilor. Această operaţie poate fi realizată şi cu ajutorul unor enzime proteolitice, sau a *decarboxilazelor* enantio-selective.

Prin utilizarea enzimei *prostaglandin-endoperoxid-sintetază*, este trasformat acidul arahidonic în prostagladina H_2, precursor al prostaglandinelor, tromboxanilor şi prostaciclinelor, modulatori chimici extrem de eficienţi în cantităţi infime, compuşi de mare interes pentru medicină (în reglarea presiunii arteriale, tratarea unor maladii cardiovasculare, tratarea astmului bronşic, în gastroenterologie etc) şi în zootehnie (la creşterea intensivă a animalelor).

3.3. Producerea aminoacizilor

Aminoacizii reprezintă „cărămizile" (monomerii) care intră în constituţia unor componenţi de bază ai organismelor vii - substanţele proteice. În timp ce plantele au capacitatea să-şi sintetizeze toţi cei 20 de aminoacizi din componenţa proteinelor, animalele şi omul nu-şi pot sintetiza decât pe 12 dintre aceştia, restul de 8 (denumiţi şi aminoacizi

Scanned with OKEN Scanner

esențiali) şi anume: lizina, treonina, triptofanul, metionina, valina, fenilalanina, leucina şi izoleucina, fiind procurați prin intermediul hranei de origine vegetală. Insuficiența sau lipsa acestora din hrana organismelor animale şi umane au consecințe grave asupra creşterii şi dezvoltării lor.

Se pune problema: dacă plantele sunt furnizoare ale tuturor celor 20 de aminoacizi, de ce a fost nevoie să se găsească surse alternative? Răspunsul e simplu :

- pentru că valoarea nutritivă a unor alimente vegetale, care reprezintă hrana de bază a unor popoare, sunt sărace în aminoacizi esențiali (exemple: în gliadina de grâu lizina se află în cantitate mică; în făina de porumb lipsesc lizina şi triptofanul);
- pentru că unii aminoacizi sunt solicitați în cantități mari nu numai în industria alimentară şi zootehnie, ci şi în industriile farmaceutică, cosmetică, chimică etc.

În anii `50 ai secolului trecut s-a constatat că unele microorganisme elimină în mediul de cultură aminoacizi, în special spre sfârşitul fazei exponențiale (POPA, 1990). Constatarea a determinat o vie activitate în domeniul identificării microorganismelor (bacterii, drojdii, mucegaiuri, actinomicete) producătoare de aminoacizi. S-au testat mii de microorganisme în perioada menționată şi s-a evidențiat că cei mai activi producători sunt bacteriile din genurile *Arthrobacter, Mycobacterium, Micrococcus, Corynebacterium, Brevibacterium,* (KINOSHITA, citat de POPA, 1990).

Aminoacizii pot fi obținuți şi prin hidroliza proteinelor vegetale şi animale şi prin sinteză chimică, dar aceste metode sunt dificile şi costisitoare. De aceea, s-a găsit că mai eficiente sunt metodele enzimatică şi microbiologică, care au avantaje şi dezavantaje:

- metoda enzimatică e mai eficientă şi asigură obținerea de produşi cu puritate mai înaltă dar e mai costisitoare, deoarece enzimele sunt mai scumpe şi reclamă ca substrat precursori asemănători aminoacidului sintetizat;
- metoda microbiologică foloseşte substraturi ieftine, dar produce amestec de aminoacizi şi diverse impurități şi deci necesită eforturi suplimentare pentru purificare.

S-a constatat că în cazul metodei microbiologice, în mediul de cultură se întâlnesc aminoacizii: alanina, glicina, acizii aspartic şi

Scanned with OKEN Scanner

glutamic, serina, valina şi leucina, în cantităţi de 1-2 mg/l. De aceea, în faţa specialiştilor au apărut noi provocări: identificarea metodelor prin care în mediul nutritiv microorganismul cultivat să producă un aminoacid în cantitate mare, sau în care (în cazul amestecului) unul să predomine. Aceasta presupunea intervenţia, prin diverse metode, în controlul mecanismelor de reglare genetică şi metabolică. S-au identificat două metode:

- inducerea mutagenezei şi izolarea de mutanţi auxotrofi (în special pentru aminoacizi);
- intervenţia la nivelul mecanismelor de reglare metabolică.

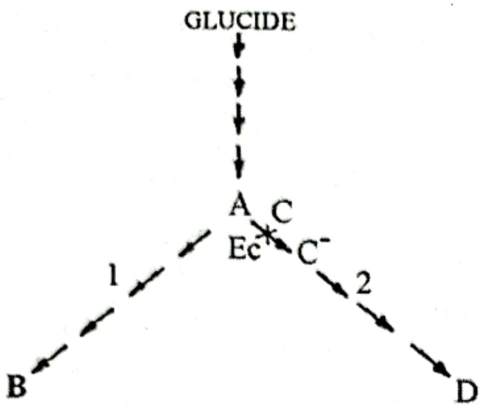
Aminoacizii se produc actualmente prin cultivarea de tulpini prototrofe (pentru acidul L-glutamic, L-valină; L-glutamină, L-prolină,, D-L alanină), mutante auxotrofe de aminoacizi (pentru L-lizină, L-treonină, L-leucină, L-prolină, L-ornitină, L-valină, acid-L-aspartic), mutante auxotrofe de biotină (pentru acidul L-glutamic) şi prin folosirea de precursori de biosinteză (pentru L-triptofan, L-izoleucină, L-fenilalanină, L-serină, L-histidină), (SODA et al., după POPA, 1990).

În practică se utilizează în special mutantele auxotrofe de aminoacizi şi mutantele de reglare. În primul caz, plecând de la bacterii care produc în mod natural aminoacizi şi care sunt supuse mutagenezei experimentale (UV), radiaţii ionizante, nitrozoguanidină), se obţin mutante auxotrofe de aminoacizi, care acumulează în mediu numai un aminoacid. Mutaţia elimină o ramificaţie (care nu interesează) din calea metabolică de producere a aminoacizilor. Mutantele sunt auxotrofe fie pentru un aminoacid care este un intermediar cheie (au blocată prima enzimă din calea ramificată), fie pentru un aminoacid obţinut pe una din ramificaţii (au blocată ultima enzimă ce catalizează un aminoacid) (fig. 3.6, 3.7 după L. POPA, 1990).

Mutantele de reglaj pentru producerea aminoacizilor au pierdut o anumită cale de reglare şi pot fi:

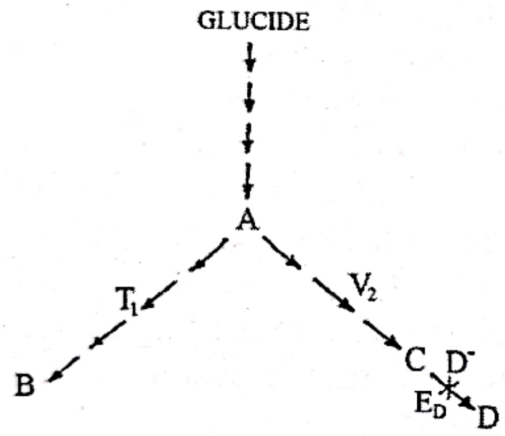
- mutante rezistente la un analog a unui anumit aminoacid (care sunt cele mai utile);
- revertanţi de mutante auxotrofe, deficiente într-o anumită enzimă de reglare.

Scanned with OKEN Scanner



Legenda:
A=Compus intermediar de unde începe ramificarea;
B=Aminoacid pe care vrem să-l obținem;
D=Aminoacid obținut pe calea ramificată 2;
C=Primul aminoacid obținut pe calea ramificată 2 (aminoacid intermediar cheie);
C⁻=Mutantă auxotrofă de C;
E_C=Prima enzimă care catalizează trecerea de la A la C
1=Calea ramificată 1;
2=Calea ramificată 2.

Fig. 3.6. Principiul utilizării mutantelor auxotrofe de aminoacizi în producția industrială de aminoacizi. Mutantă auxotrofă de un aminoacid intermediar cheie, aflat în apropierea punctului de ramificare



Legenda:
A=Compus intermediar de unde începe ramificarea;
B=Aminoacid pe care vrem să-l obținem;
D=Aminoacid obținut pe calea ramificată 2;
C=Intermediar penultim al aminoacidului D;
E_D=Enzimă care catalizează trecerea de la C la D;
D=Mutantă auxotrofă de D;
1=Calea ramificată 1;
2=Calea ramificată 2.

Fig. 3.7. Principiul utilizării mutantelor auxotrofe de aminoacizi în producția industrială de aminoacizi. Mutantă auxotrofă de un aminoacid obținut pe una din căile ramificate

În producerea industrială a aminoacizilor, mediile de cultură au ca sursă de carbon melasa, a cărei concentrație optimă în zahăr se situează între 5 şi 15 %. Cele mai bune rezultate se obţin prin utilizarea glucozei şi a zaharozei, numai că în acest caz creşte evident preţul de cost al produsului final. E necesară o testare a melaselor utilizate pentru producerea de aminoacizi, întrucât unele conţin substanţe inhibitoare. În funcţie de microorganismul producător se alege şi sursa de azot în mediul nutritiv. Mutantele auxotrofe se dezvoltă bine pe medii ce conţin săruri de amoniu sau nitraţi. Ca surse de azot se folosesc şi hidrolizatele

Scanned with OKEN Scanner

proteice din făină de soia, seminţele de bumbac, arahidele. Pentru producerea de lizină şi acid glutamic se utilizează şi ureea, caz în care este necesară evitarea sterilizării soluţiei de uree (ca şi a hidrolizatelor proteice) prin autoclavare, pentru a nu fi degradată(e). Temperatura optimă de fermentare trebuie stabilită prin teste prealabile, ea variind între 25 şi 37^{0}C, iar pH-ul optim se situează între 6,0 şi 8,0. În producerea industrială a aminoacizilor este necesară o bună aerare a mediilor însămânţate, (POPA, 1990).

Din cei 20 de aminoacizi se produc industrial prin fermentaţie microbiană în special acidul glutamic şi lizina. Se pare că japonezii au trecut şi la producerea industrială a treoninei şi triptofanului. Probabil că în viitor, în funcţie de nevoile ce se ivesc în diverse domenii de interes economic, vor fi obţinuţi prin această metodă şi alţi aminoacizi.

Producerea de acid glutamic

Obţinerea pe căi neconvenţionale a acidului glutamic a plecat de la cerinţele tot mai mari din industria alimentară pentru *glutamatul monosodic*, condiment şi corector de gust, apreciat mai ales în Japonia şi SUA. Acidul glutamic se foloseşte în medicină în tratamentul unor boli ale sistemului nervos ca epilepsia şi schizofrenia, a sechelelor meningitei, encefalitei şi poliomielitei. Se consideră că el asigură dezintoxicarea creierului prin absorbţia amoniacului, pe care-l transformă în glutamină. El este, aşa cum s-a arătat deja, un condiment larg utilizat în prepararea de carne şi legume, cărora le accentuează gustul normal. Este produs anual în cantităţi mari (sute de mii de tone).

Cel mai folosit microorganism în producerea de glutamat este *Corynebacterium glutamicum*, deşi această capacitate este specifică şi altor bacterii ca: *Brevibacterium glutamicum şi B. lactofermentum.* În funcţie de condiţiile de aerare, *C. glutamicum* poate metaboliza glucoza până la piruvat fie prin glicoliză (cale Embden-Mayerhof-Parnas), fie pe calea pentozofosfaţilor. În condiţii anaerobe predomină glicoliza, care duce la sinteza acidului lactic, iar în condiţii de aerare bună predomină calea pentozofosfaţilor, care favorizează sinteza de glutamat. În prezenţa glucozei şi a ionilor de amoniu, specia *C. glutamicum,* metabolizează glucoza (prin ciclul Krebs) la citrat, apoi, prin intervenţia a două NADP-dehidrogenaze (izocitrat-dehidrogenaza şi L-glutamat-dehidrogenaza) la α-ceto-glutarat, care prin aminare reductivă este transformat în acid glutamic. Un rol important în degradarea glucozei pe una sau alta din

Scanned with OKEN Scanner

căile metabolice menţionate îl are, în afara aerării, şi conţinutul de biotină în mediul de cultură. În exces de biotină este favorizată creşterea bacteriilor şi glicoliza, iar carenţa biotinei sau chiar lipsa acesteia din mediu favorizează calea pentozofosfaţilor şi biosinteza unor cantităţi mari de glutamat. Cantitatea de biotină în mediu se reglează în funcţie de cea de zahăr: de la 1,5-2 μgr/l pentru un conţinut de 5 gr% zahăr, la 7-10 μgr/l pentru un conţinut de 20 gr% zahăr în mediul de cultură. Biotina influenţează permeabilitatea membranei plasmatice, prin modificarea raportului dintre acizii graşi saturaţi şi cei nesaturaţi din compoziţia ei. Când acest raport este mai mare de 1,0 în membrana plasmatică scade cantitatea de *acid fosfatidic* (fosfolipid cu conţinut ridicat în acizi graşi nesaturaţi) şi creşte cea de *cardiolipină* (fosfolipid bogat în acizi graşi saturaţi), fiind posibilă eliminarea extracelulară a glutamatului. Carenţa de biotină în mediul de cultură determină insuficienţa de acid fosfatidic şi creşterea cantităţii de cardiolipină, cu modificarea permeabilităţii membranei plasmatice, care permite acumularea în mediu a acidului glutamic, (OKAZAKI et al., după POPA, 1990).

Pentru reglarea biosintezei acidului glutamic, tulpinile producătoare trebuie să îndeplinească unele condiţii ca:

- o activitate foarte scăzută sau blocată a α-cetoglutarat-dehidrogenazei, fiind astfel împiedicată trecerea acidului α-ceto-glutaric în acid succinic, fapt ce permite intervenţia enzimei L-glutamat-dehidrogenaza, care transformă acidul α-ceto-glutaric în acid glutamic;
- enzima L-glutamat-dehidrogenaza să fie rezistentă la inhibiţia prin feed-back provocată de acidul glutamic, sau sensibilă doar la concentraţii mari ale acestuia în mediul de cultură;
- o permeabilitate modificată a membranei plasmatice la tulpina producătoare (prin utilizarea unor mutante auxotrofe pentru biotină, sau prin suplimentarea mediului cu cantităţi scăzute de biotină) pentru a permite eliminarea şi acumularea în mediul de cultură a acidului glutamic.

Pentru producerea industrială a acidului glutamic se foloseşte ca sursă de carbon melasa sau un amestec format din glucoză, fructoză şi zaharoză, iar ca sursă de azot sărurile de amoniu, ureea, hidrolizatele din făina de soia. În mediul de cultură se mai adaugă sulfaţi şi fosfaţi de calciu, potasiu şi magneziu, precum şi cantităţi foarte mici de săruri de

Scanned with OKEN Scanner

fier, zinc, mangan, cobalt şi biotină. Mediul nutritiv este inoculat cu o cultură bine dezvoltată a microorganismului producător (într-o cantitate de 2-10%), iar procesul de fermentaţie are loc la un pH de 6,0-8,0 şi la o temperatură de 27^0C-30^0C în condiţii de aerare energică. pH-ul mediului de cultură se menţine în limitele menţionate prin adăugarea continuă de hidroxid de amoniu, pentru a favoriza reacţia de aminare reductivă a acidului α-cetoglutaric. În primele 10-20 de ore după inoculare are loc creşterea şi înmulţirea bacteriilor, iar ulterior se produce acumularea de acid glutamic, astfel că după 30-50 de ore procesul de fermentaţie se încheie. Randamentul de producţie este de cca 50-60 g acid glutamic/litru de mediu în cazul unei concentraţii în zahăr a mediului de 100gr/l.

Pentru obţinerea de acid glutamic unele biotehnologii utilizează ca sursă de carbon etanolul şi tulpini de *Brevibacterium*, altele n-parafine, caz în care se utilizează o tulpină de *Corynebacterium alkanolyticum* auxotrofă în glicerol, (POPA, 1990).

Producerea de lizină

Lizina face parte din categoria aminoacizilor esenţiali şi interesul pentru producerea ei cu ajutorul microorganismelor a plecat de la nevoia suplinirii alimentelor de natură vegetală, care sunt mai sărace în lizină. Este mult mai utilizată în suplimentarea furajelor la animale.

Capacitatea microorganismelor (drojdiilor) de a produce o lizină a fost evidenţiată încă din anii 1940. În 1958 KINOSHITA şi colaboratorii au obţinut prin iradiere UV diverse mutante biochimice auxotrofe de *Corynebacterium glutamicum* pentru unii aminoacizi: homoser$^-$ bio$^-$ (pentru homoserină şi biotină), met$^-$ (pentru metionină), met$^-$ leu$^-$ (pentru metionină şi leucină), ileu$^-$ (pentru izoleucină). Prima dintre ele s-a dovedit cea mai eficientă în producerea directă, pe cale industrială, a lizinei. În practică se mai utilizează şi mutante auxotrofe sau de reglare ale speciilor *Brevibacterium flavum* sau *B. lactofermentum*.

Există şi o altă metodă de obţinere a lizinei în două trepte (etape), în care se foloseşte mai întâi o mutantă de *Escherichia coli,* pentru producerea de acid diaminopimelic, şi apoi bacteria *Enterobacter aerogenes,* care transformă acest acid (îl decarboxilează) în lizină.

Şi în cazul producerii industriale a lizinei trebuie respectate anumite condiţii:

- o concentraţie optimă a biotinei în mediul de cultură;

Scanned with OKEN Scanner

- o cantitate determinată de homoserină în mediu, mutantele cultivate fiind deficiente în acest aminoacid. Homoserina poate fi înlocuită cu metionina şi treonina (aminoacizi aflaţi de asemenea într-un raport bine determinat).

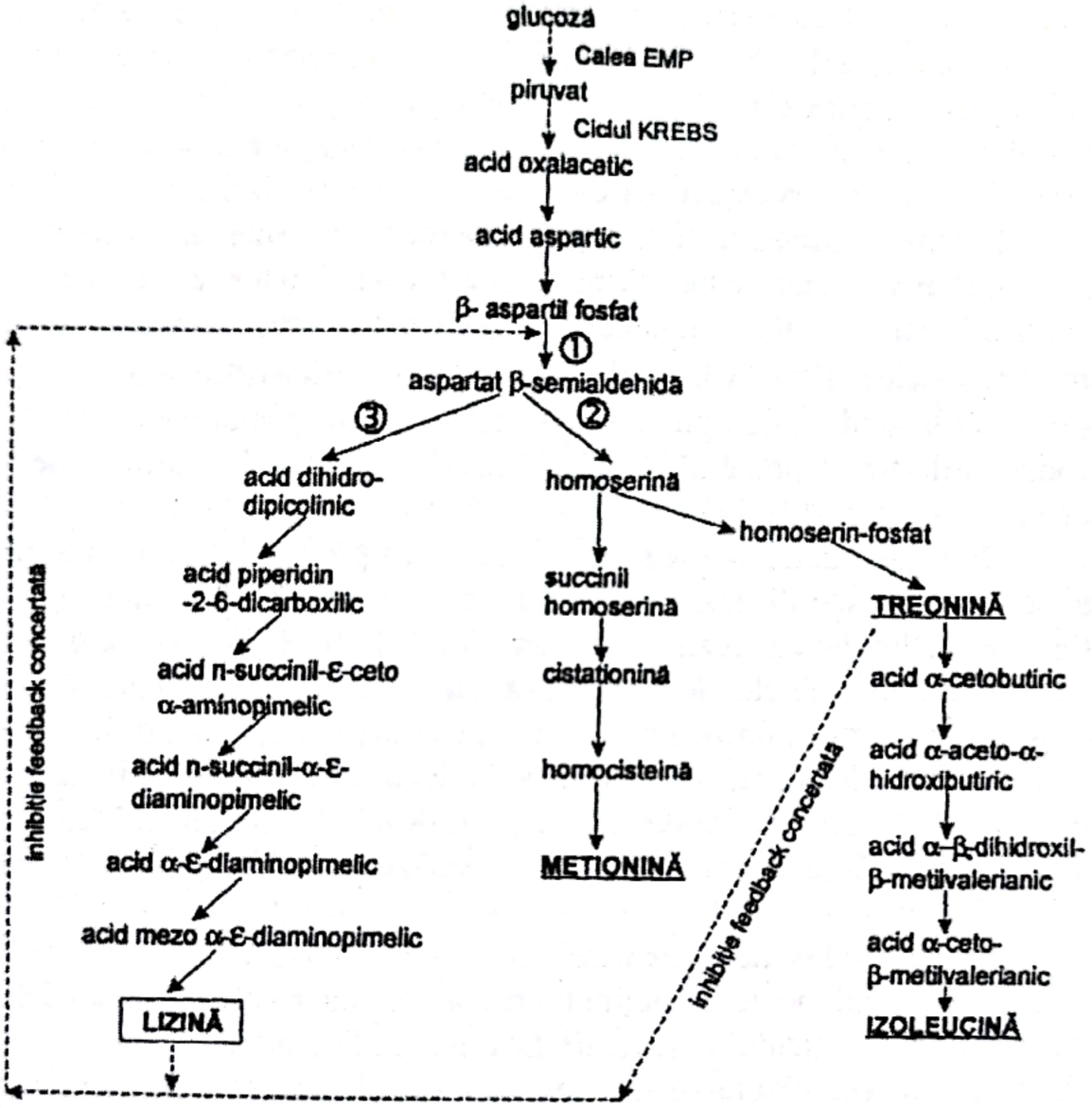


Fig. 3.8. Reglarea biosintezei lizinei la *Corynebacterium glutamicum* şi *Brevibacterium* sp.
1-aspartakinaza, 2-homoserin-dehidrogenaza, 3-dehidrodipicolinat - sintetaza

Mediile de cultură pentru producerea lizinei folosesc melasa ca sursă de carbon, iar sulfatul de amoniu ca sursă de azot, la care se adaugă extract de porumb (până la 4%), care influenţează pozitiv biosinteza lizinei. Se impune o aerare bună a mediului, un pH apropiat de neutru şi

Scanned with OKEN Scanner

o temperatură ce variază între 24 şi 37^{0}C. Aşa cum s-a precizat, este necesară prezenţa în mediu a biotinei şi homoserinei, sau a unor cantităţi bine controlate de metionină şi treonină. Procedeul elaborat de firma Japoneză Kyowa Hakko Kogyo se bazează pe transformarea glucozei pe calea Embdeen-Meyerhoff-Parnas în acid piruvic, apoi oxidarea acestuia în cadrul ciclului Krebs la acid oxalilacetic, aminarea lui reductivă la acid aspartc, după care metabolizarea acidului aspartic este dirijată spre biosinteza diferiţilor aminoacizi: lizină, homoserină, metionină, treonină, izoleucină (prin intervenţia unor enzime specifice; fig. 3.8).

Pentru producerea lizinei se folosesc mutante auxotrofe ale bacteriile menţionate, care elimină sinteza enzimelor ce transformă acidul aspartic în alţi aminoacizi, astfel încât aceste forme mutant urmează calea metabolică: acid aspartic → aspartat-fosfat → aldehidă aspartică → acid dihidropicolinic → acid diaminopimelic → L-lizină. Producţia de lizină poate să ajungă la nivelul de 50 g lizină/litru mediu nutritiv.

Biomasa bacteriană rezultată la sfârşitul procesului de fermentare se separă, se stabilizează (prin tratarea cu sulfit de sodiu) şi se atomizează, pulberea rezultată având cca 10% L-lizină, care este administrată în reţetele de furajare a animalelor. Pentru uzul uman, produsul rezultat din fermentaţie este supus purificării, prin adsorbţia pe cationi, urmată de eluţia, concentrarea şi cristalizarea L-lizinei. Producţia mondială de lizină este apreciată la peste 40.000 tone anual, cea mai mare cantitate fiind produsă de firme japoneze, (POPA, 1990; MILICĂ 1999).

Producerea de acid aspartic

Acest acid poate fi obţinut prin aminarea reductivă a acidului oxalilacetic sau a acidului succinic la intervenţia aspartazei din bacilul colic. Se folosesc celule de *Escherichia coli* imobilizate prin legături covalente sau incluse în gel de K-carragenan. Acidul aspartic obţinut poate fi apoi folosit la producerea microbiană a altor aminoacizi ca: treonina, metionina, lizina, izoleucina, alanina. Acidul aspartic poate fi produs din amoniac şi acid fumaric prin acţiunea aspartazei. Acest aminoacid este folosit în industria alimentară la fabricarea siropurilor şi prepararea unor produse de cofetărie.

Scanned with OKEN Scanner

4. BIOTEHNOLOGII UTILIZATE ÎN AGRICULTURĂ

Agricultura rămâne una din ramurile de bază ale activității umane pentru că de ea depinde alimentația omenirii, creşterea demografică, dezvoltarea unei industrii legate de acesta ca: industria alimentară, uşoară, chimico-farmaceutică etc. În secolele XVIII-XIX, dezvoltarea capitalismului a determinat şi creşterea nevoilor de produse agricole şi materii prime de natură vegetală. S-au intensificat în consecință şi eforturile fermierilor şi specialiştilor în agricultură pentru ameliorarea plantelor şi animalelor. Principala metodă de lucru utilizată în acea perioadă a fost hidratarea, urmată de selecția familială sau individuală. Deşi nu erau cunoscute legile după care se moştenesc însuşirile organismelor vii, experiențele de hibridare au contribuit inclusiv la descoperirea lor prin monumentala operă a lui J. GR. MENDEL. Redescoperirea legilor eredității la începutul secolului XX a dat un suport ştiințific, a pus bazele ameliorării ştiințifice a plantelor şi animalelor, asigurând o dezvoltare fără precedent a sectorului vegetal şi animal din agricultură. Se descoperă noi metode de ameliorare la plante, cum ar fi: inducerea poliploidiei, inducerea mutațiilor artificiale (cu agenți fizici şi chimici), se pun la punct tehnici de cultură a țesuturilor şi celulelor vegetale (care au permis atât clonarea unor genotipuri valoroase de diverse plante, cât şi izolarea unor variații somaclonale utile în ameliorare), se descoperă tehnici de transfer al cromosomilor de la o specie la alta, se găsesc modalități de transfer al genelor de la un organism la altul prin intermediul diverşilor vectori (achiziție recentă a geneticii şi biologiei moleculare), care face posibilă obținerea de organisme „planificate" genetic.

Producțiile vegetale au înregistrat creşteri atât de spectaculoase după al doilea război mondial încât s-a vorbit de „prima", iar mai recent de „a doua revoluție verde". Selecția unor soiuri şi hibrizi tot mai productivi la principalele plante de cultură, ca şi progresele în cunoaşterea cerințelor lor față de climă şi sol, în protecția plantelor, în fertilizarea, irigarea şi mecanizarea culturilor agricole etc, au permis „prima revoluție verde" în anii '50-70 ai secolului trecut. Specularea avantajelor conferite de biotehnologiile de cultivare *in vitro* la plante şi practicarea transgenezei la plante au deschis căi nebănuite în dezvoltarea sectorului vegetal al agriculturii şi aveau să determine o nouă „revoluție verde", a cărei rezultate se fac tot mai mult simțite în ultimele două

Scanned with OKEN Scanner

decenii. Ţinta generală a procesului de ameliorare a plantelor este "obţinerea unei recolte maxime de produse utile cu minimum de investiţii şi cu cel mai redus impact asupra mediului", (SIMMONDS şi SMARTT, citaţi de CHRISPEELS şi SADAVA, 2003). Obiectivele de ameliorare la plante vizează: acumularea crescută de biomasă, producţii mai înalte de recolte specifice, calitate nutritivă superioară a recoltei, rezistenţă sau toleranţă ridicată la factori de mediu, reducerea costurilor de producţie, schimbarea arhitecturii plantelor, lărgirea răspunsului fotoperiodic la unele specii de cultură, îmbunătăţirea caracteristicilor de procesare a recoltei etc, (PFEIFFER, 2003). Principalele "instrumente" biotehnologice care, alături de metodele clasice, contribuie de peste două decenii la obţinerea de varietăţi noi de plante sunt sintetizate astfel de CHRISPEELS şi SADAVA (2003):

- utilizarea culturilor de celule, ţesuturi şi embrioni;
- propagarea clonală a plantelor libere de boli;
- identificarea regiunilor de pe cromosomi care controlează caractere multigenice;
- utilizarea ingineriei genetice pentru transferul rezistenţei la boli, dăunători, condiţii de stres, îmbunătăţirea valorii nutritive a recoltei, reducerea pierderilor la recoltare;
- manipularea genetică a sterilităţii mascule pentru facilitarea acţiunii de obţinere de sămânţă hibridă etc.

Şi în zootehnie s-au înregistrat progrese asemănătoare. Însămânţările artificiale au devenit o practică obişnuită la bovine, ovine şi chiar suine. Se fac încercări la păsări şi albine. Selecţia şi utilizarea în această acţiune a unor reproducători performanţi asigură obţinerea unor descendenţi cu însuşiri productive asemănătoare. Prin tratamente cu hormoni gonadotropi a fost stimulată ovulaţia la bovine şi în loc de 1 ovul la 3 săptămâni, s-au obţinut câteva zeci. După fecundare, embrionii rezultaţi sunt prelevaţi şi conservaţi prin congelare, fapt ce asigură un material semincer de înaltă calitate şi posibilitatea de a fi distribuiţi la mari distanţe, (CRĂCIUN, 1983). Creşterea animalelor a devenit în momentul de faţă o adevărată industrie, ridicând probleme serioase sub aspectul unei furajări raţionale şi echilibrate, prevenirii şi combaterii epizootiilor, mecanizării lucrărilor de întreţinere etc.

A cunoscut o dezvoltare puternică şi acvacultura unor specii valoroase de peşti, crustacee, moluşte etc, menite să contribuie la

Scanned with OKEN Scanner

acoperirea nevoilor de proteine. La peşti de exemplu, numărul speciilor luate în cultură a crescut la 40-50, iar de la producţii de 200-400 kg/ha în sistemul de creştere extensivă, s-a ajuns la 20-40 kg/m.c. în cazul crapului şi păstrăvului cultivaţi în sistem intensiv în ape naturale, şi de 150-250 kg/m.c. prin creşterea unor specii termofile de peşti în ape calde, (BATTES, 1982). Producţia anuală de peşte în lume a crescut constant, de la 1,7 milioane de tone în 1948, la 10,35 mil. tone în 1976, şi 26,7 milioane tone în 1996, preconizându-se ca în anul 2030 cantitatea de peşte obţinută prin acvacultură să reprezinte cca 45% din producţia mondială anuală. Practicarea pe scară largă a acvaculturii unor specii animale ridică însă o serie de probleme specifice privind impactul asupra mediului acvatic, cărora trebuie să li se găsească soluţii viabile. Dintre acestea menţionăm:

- sunt introduse în ecosistemele acvatice agenţi poluanţi, dejecţii, deşeuri etc, care influenţează calitatea apei;
- sunt introduse unele boli parazitare, bacteriene şi nespecifice, care influenţează stocul de organisme acvatice;
- sunt influenţate negativ din punct de vedere genetic populaţiile native de organisme prin încrucişări necontrolate, care duc la scăderea vigorii, calităţii şi rezistenţei acestora;
- sunt afectate resursele naturale ale ecosistemelor acvatice, ceea ce impune un management ştiinţific care să asigure sustenabilitatea acvaculturii şi totodată minimalizarea impactului asupra mediului, (K. BATTES, manuscris).

Succesele din agricultură s-au datorat în special progreselor înregistrate în ameliorarea plantelor şi animalelor, dar şi îmbunătăţirii tehnologiilor de cultivare a lor. Vom prezenta în continuare cum contribuie şi ce se aşteaptă de la agricultură prin practicarea unor biotehnologii moderne.

4.1. Culturile de ţesuturi şi celule *in vitro*, instrument de manipulare a genomului la plante

Termenul *in vitro*, adoptat din limba latină, înseamnă cu aproximaţie viaţă în recipient de sticlă şi a fost introdus din necesitatea de a defini tehnicile privind cultura de organe, ţesuturi şi celule vegetale pe medii de viaţă artificiale, care permit păstrarea lor în viaţă în afara organismului.

Scanned with OKEN Scanner

Inițiatorul culturii *in vitro* la plante a fost botanistul german HABERLANDT, care intuind capacitatea de regenerare a celulelor plantelor superioare, în 1902 a cultivat pe un mediu nutritiv artificial celule izolate din frunze. Cercetările şi descoperirile care au urmat în domeniul culturilor de celule şi țesuturi vegetale, în special descoperirea şi utilizarea fitohormonilor, au dovedit experimental că celulele vegetale sunt totipotente şi pluripotente. Domeniul s-a dezvoltat lent până în anii 1960 când, culturile *in vitro* la plante au atras atenția a tot mai mulți specialişti din domeniul biologiei, agriculturii, silviculturii şi farmaciei, care au căutat să descifreze mecanismele dediferențierii şi rediferențierii *in vitro* la plante şi să speculeze în practică multiplele posibilități ale acestei tehnici, cum ar fi: micropropagarea, obținerea de plante libere de virusuri, inducerea haploidiei experimentale, obținerea şi fuziunea de protoplaşti, izolarea şi utilizarea variațiilor somaclonale, cultivarea celulelor vegetale în suspensie (după modelul microorganismleor) pentru producerea anumitor principii active etc. Culturile *in vitro* au făcut modă cca două decenii când, progresele înregistrate, dar mai ales promisiunile ingineriei genetice, au făcut ca unii cercetători să îmbrățişeze acest nou domeniu. Aceasta nu înseamnă că tehnicile *in vitro* la plante au fost abandonate. O dovadă în acest sens ar fi perpetuarea congreselor Asociației internaționale de profil (care se țin odată la 4 ani în diverse zone ale lumii). Este adevărat însă că lucrările prezentate în cadrul acestora în momentul de față nu mai seamănă deloc cu cele din urmă cu 15 ani, specialiştii speculând în cercetările lor avantajele oferite de aceste două tehnici de vârf ale biologiei.

4.1.1. Tehnologia de cultivare *in vitro* a țesuturilor şi celulelor vegetale

Menținerea în viață a organelor, țesuturilor sau celulelor disociate din organismele vegetale este posibilă prin cultivarea lor pe medii nutritive artificiale. Comportamentul culturilor de țesuturi şi celule *in vitro* este diferit de cel al culturilor *in vivo*, când acestea sunt integrate în organism. Pentru asigurarea condițiilor optime de supraviețuire, creştere şi dezvoltare a explantelor vegetale, este necesară amenajarea unui laborator cu dotări speciale, destinat culturilor *in vitro*, care să permită efectuarea operațiilor specifice acestui gen de cercetări. În funcție de obiectivele urmărite trebuie alese: momentul inițierii culturii *in vitro*,

Scanned with OKEN Scanner

materialul biologic şi tipul de explant, compoziţia mediilor de cultură, condiţiile de cultivare a explantelor, intervalul dintre pasaje etc. În general, iniţierea unei culturi *in vitro* la plante, care are ca scop obţinerea de regeneranţi, presupune:

- prepararea şi sterilizarea soluţiilor nutritive;
- pregătirea materialului biologic (prelevarea şi sterilizarea explantelor);
- inocularea explantelor (fitoinoculilor) pe mediile de iniţiere;
- incubarea şi creşterea dirijată a culturilor;
- subcultivarea (pasarea) inoculilor, la anumite intervale de timp, pe aceleaşi sau pe alte medii nutritive;
- acomodarea (aclimatizarea) neoplantulelor de la mediul *in vitro*, la condiţiile septice de viaţă.

a) Mediul de cultură

Compoziţia mediului de cultură reprezintă un element esenţial pentru succesul operaţiei de cultivare *in vitro* a explantelor vegetale. Studiile efectuate asupra compoziţiei cenuşei de plante, a gazelor rezultate în urma arderii organelor vegetale, cercetările biochimice asupra compoziţiei sevei din vasele lemnoase şi liberiene au condus la stabilirea, prin extrapolare, a elementelor chimice indispensabile menţinerii în viaţă, creşterii şi dezvoltării explantelor detaşate de pe "planta mamă" şi inoculate pe medii aseptice. În acest fel au fost propuse mai multe reţete de medii de cultură, care au fost standardizate şi poartă numele celor care le-au elaborat: *Heller* (1953), *Nitsch şi Nitsch* (1956), *White* (1963), *Murashige - Skoog* (1962), *Gamborg, Miller şi Ojima* (B_5; 1965) etc. Principalele componente ale mediului nutritiv sunt: apa, sărurile minerale, o sursă de carbon, vitaminele, hormonii vegetali. La acestea se adaugă uneori unii aminoacizi, acizi organici, anumite extracte etc.

Apa este un element indispensabil vieţii. La prepararea mediului de cultură se utilizează apă bidistilată sau deionizată. Se recomandă ca distilarea să se facă în distilatoare de sticlă şi nu metalice, deoarece în cazul celor din urmă, apa poate conţine unii ioni toxici pentru celulele vegetale. Elementele chimice care intră în compoziţia mediului de cultură au fost clasificate în *macroelemente* (care sunt necesare plantelor în cantităţi mari) şi *microelemente* (indispensabile proceselor biochimice şi fiziologice din plante, dar necesare în cantităţi infime). Rolul fiziologic

Scanned with OKEN Scanner

al fiecărui element mineral depinde de forma chimică în care este el prezent în mediu, de concentrația acestuia, de natura explantelor, dar și de tipul de cultură (primară sau subcultură). În categoria macroelementelor intră N, K, Ca, P, S, Mg, Na, Cl, elemente a căror cantitate variază de la o formulă de mediu la alta (tabelul 4.1). Dintre microelemente fac parte Fe, B, Zn, Mn, Ni, I, Al, elemente prezente în mediile de cultură în cantități de ordinul micromolilor. Foarte important pentru creșterea explantelor vegetale este Fe, forma cea mai accesibilă pentru acestea fiind cea de chelat ($FeSO_4 \cdot 7H_2 \cdot$ EDTA). Pentru facilitarea operației de preparare a mediului de cultură se utilizează soluții stoc de macro- și microelemente, care se păstrează în sticle de culoare închisă, la frigider. Și soluția de Fe va fi preparată sub formă de stoc, din Na_2EDTA (37,3mg/l) și $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (27, 8 mg/l).

Tabelul 4.1. Compoziția chimică a unor medii de cultură mai frecvent utilizate (după Bhojwani și Razdan, 1983)

Constituienți	Medii (în mg/l)						
	White* (1963)	Heller* (1953)	MS* (1962)	ER* (1965)	B5* (1968)	N* (1969)	NT* (1971)
Anorganici							
NH_4NO_3	-	-	1650	1200	-	720	825
KNO_3	80	-	1900	1900	2527,5	950	950
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	-	75	440	440	150	-	220
$CaCl_2$	-	-	-	-	-	166	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	750	250	370	370	246,5	185	1233
KH_2PO_4	-	-	170	340	-	68	680
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-	134	-	-
$Ca(NH_3)_2 \cdot 4H_2O$	300	-	-	-	-	-	-
$NaNO_3$	-	600	-	-	-	-	-
Na_2SO_4	200	-	-	-	-	-	-
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	19	125	-	-	150	-	-
KCl	65	750	-	-	-	-	-
KI	0,75	0,01	0,83	-	0,75	-	0,83
H_3BO_3	1,5	1	6,2	0,63	3	10	6,2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	5	0,1	22,3	2,23	-	25	22,3
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-	-	-	-	10	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3	1	8,6	-	2	10	-
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-	-	-	8,6
$ZnNa_2EDTA$	-	-	-	15	-	-	-
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	-	-	0,25	0,025	0,25	0,25	0,25

Scanned with OKEN Scanner

MoO_3	0,001	-	-	-	-	-	-
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01	0,03	0,025	0,0025	0,025	0,025	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	-	-	0,025	0,0025	0,025	-	-
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	-	-	-	-	0,03
$AlCl_3$	-	0,03	-	-	-	-	-
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	-	0,03	-	-	-	-	-
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	-	1	-	-	-	-	-
$Fe_2(SO_4)_3$	2,5	-	-	-	-	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	27,8	27,8	-	27,8	27,8
$Na_2EDTA \cdot 6H_2O$	-	-	37,3	37,3	-	37,3	37,3
Fe Sequestrene 330	-	-	-	-	28	-	-
Organici							
Inozitol	-	-	100	-	100	100	100
Acid nicotinic	0,05	-	0,5	0,5	1	5	-
Piridoxină HCl	0,01	-	0,5	0,5	1	0,5	-
Tiamină HCl	0,01	-	0,1	0,5	10	0,5	1
Glicină	3	-	2	2	-	2	-
Acid folic	-	-	-	-	-	0,5	-
Biotină	-	-	-	-	-	0,05	-
Zaharoză	2%	-	3%	4%	2%	2%	1%
D-Manitol	-	-	-	-	-	2	12,7%

*MS=Murashige-Skoog; ER=Eriksson; B5=Gamborg et al.; N=Nitsch; NT=Nagata–Takebe. La aceste medii de bază nu sunt incluse amestecurile complexe nutriţionale (extracte) sau cărbunele activ şi nici regulatorii de creştere

Datorită condiţiilor de cultivare *in vitro* explantele vegetale sunt dependente de substrat şi în ceea ce priveşte substanţele organice, deoarece celulele sunt parţial heterotrofe, chiar dacă ele conţin clorofilă. Sursa de carbon organic în condiţiile de cultivare aseptică este reprezentată de compuşi glucidici, în general - zaharoză sau glucoză, în concentraţie de 2-3 %, concentraţia variind în funcţie de natura explantului şi de specie. Cele mai multe medii nutritive conţin mio-inositol, în cantitate de 100 mg/l, compus al cărui rol pentru culturile *in vitro* nu se cunoaşte prea bine. Uneori, sursa de carbon organic poate fi reprezentată de alcooli (în special de glicerol) sau de acizi organici (acidul succinic, glutaric, malic, fumaric etc), care au însă o valoare energetică scăzută. Unele formule de medii de cultură conţin şi alte substanţe, cu rolul de sursă de azot organic. Dintre acestea menţionăm: unii aminoacizi (glutamina, asparagina, arginina, tirozina şi glicina),

Scanned with OKEN Scanner

hidrolizatul de cazeină, ureea, extractele de drojdii, hidrolizatele proteice, laptele de nucă de cocos etc.

În condiţiile cultivării *in vitro* a plantelor s-a dovedit necesară prezenţa în mediul nutritiv a *vitaminelor*. Un rol important îl au: tiamina (vitamina B_1), care asigură creşterea celulelor ţesuturilor inoculate, sporind biomasa celulară şi tisulară; piridoxina (vitamina B_6), care este precursorul a o serie de enzime, şi acidul nicotinic, care asigură ameliorarea creşterii. În unele reţete este indicată şi adăugarea în mediile de cultură a altor vitamine, cum ar fi: biotina (vitamina H), pantotenatul de calciu, acidul ascorbic (recomandat ca antioxidant), riboflavina etc, care nu sunt însă consideraţi factori de creştere limitanţi. Necesarul de vitamine depinde de natura ţesutului cultivat, de aceea soluţiile propuse de diferiţi autori sunt mai mult sau mai puţin specifice sub acest aspect. Şi în cazul vitaminelor se prepară soluţii stoc, care se păstrează în flacoane mici, de plastic la congelator.

Un rol deosebit în controlul proceselor ce se petrec în culturile *in vitro* la plante revine *fitohormonilor* (*regulatorilor de creştere*). În ţesuturile vegetale sunt sintetizate, după cum este bine cunoscut, unele substanţe care au un rol extrem de important în dirijarea proceselor de creştere şi dezvoltare din plante, substanţe care poartă numele de fitohormoni. Ca şi în cazul celulelor animale, hormonii sunt mesageri chimici transportaţi în diversele ţesuturi unde îşi exercită efectul. Comparativ cu hormonii de origine animală, cei vegetali se caracterizează prin lipsa de specificitate, în sensul că fiecare dintre ei influenţează o gamă largă de procese.

În general ţesuturile şi celulele vegetale detaşate de pe planta mamă fie nu sunt capabile să sintetizeze fitohormonii necesari, fie cantitatea în care sunt sintetizaţi aceştia este insuficientă pentru a-şi exercita rolul specific. De aceea, pentru multiplicarea, creşterea şi diferenţierea lor în condiţiile vieţii *in vitro*, se introduc în mediul nutritiv aceaste substanţe. Tipul şi concentraţia regulatorilor de creştere din mediul de cultură, au rol hotărâtor în calea morfogenetică pe care o vor urma celulele explantului.

În prezent se cunosc cinci clase de fitohormoni: *auxinele*, *citokininele*, *giberelinele*, *acidul abscisic* şi *etilena*, dintre acestea, în cultura *in vitro* utilizându-se în special auxinele şi citokininele, datorită acţiunii pe care o exercită ele asupra proceselor de creştere, de

Scanned with OKEN Scanner

diferențiere şi dediferențiere celulară. Giberelinele, acidul abscisic şi etilena sunt folosite mai rar, deoarece efectele lor asupra fitoinoculilor sunt de mai mică importanță .

Auxinele sunt sintetizate, în general, în partea aeriană a plantelor şi anume în mugurii activi, în meristemele foliare şi florale, în frunzele foarte tinere şi fructele necoapte. De la locul biogenezei lor, aceastea circulă polarizat în plantă spre celulele tinere unde îşi exercită funcția. Rolul fiziologic al auxinelor a fost relevat în numeroase experimente de vitrocultură. Deşi foarte complexă, acțiunea auxinelor asupra diferitelor tipuri de explante în cultura *in vitro* poate fi rezumată astfel:

- favorizează creşterea în lungime a celulelor;
- stimulează diviziunea celulară;
- stimulează rizogeneza;
- inhibă formarea embrionilor somatici.

Din clasa auxinelor cele mai utilizate în tehnologia de cultivare *in vitro* la plante sunt: acidul 3- indolilacetic (AIA), acidul 3-indolilbutiric (AIB), acidul 1- naftilacetic (ANA), acidul 2- naftoxiacetic (ANOA), acidul 2,4 - diclorfenoxiacetic (2,4-D). Majoritatea auxinelor sunt insolubile în apă, dizolvarea lor realizându-se în alcool, acetonă sau eter.

Citokininele sunt sintetizate în plante la nivelul rădăcinilor, în embrioni şi meristeme. Prin intermediul vaselor lemnoase ele ajung în tot corpul plantei. Au ca structură comună adenina, iar efectele fiziologice ale acestei clase de compuşi asupra celulei vegetale sunt complexe şi oarecum antagoniste comparativ cu auxinele:

- stimulează diviziunea celulară;
- favorizează dediferențierea şi multiplicarea celulară;
- stimulează procesul de formare a mugurilor şi tulpinițelor (caulogeneza);
- previn senescența;
- inhibă formarea rădăcinilor.

Aportul exogen de citokinine se poate îmbunătăți şi prin introducerea în mediul nutritiv a unor extracte organice, cum ar fi: extractele din drojdie de bere, germeni de porumb, lapte de nucă de cocos, etc.

În cultura *in vitro* cele mai utilizate citokinine sunt: kinetina (K sau Kin), zeatina (Z), benziladenina (BA) sau benzilaminopurina (BAP), izopentiladenina (2iP). Citokininele nu sunt solubile în apă, iar pentru

Scanned with OKEN Scanner

prepararea soluţiilor stoc ele se dizolvă în puţin acid clorhidric sau hidroxid de sodiu diluat.

În 1957, SKOOG şi MILLER (citaţi după CACHIŢĂ et al., 2004) au observat efectul fiziologic combinat al auxinelor şi citokininelor, fondând conceptul de *control fitohormonal al organogenezei*. În funcţie de balanţa hormonală din mediul nutritiv a celor două tipuri principale de fitohormoni, reacţia fitoinoculilor este diferită:

- prezenţa unei concentraţii mărite de auxină, alături de o citochinină, stimulează procesele de rizogeneză;
- schimbarea raportului hormonal din mediu, în favoarea citokininei, stimulează formarea de muguraşi şi tulpinițe;
- prezenţa unor cantităţi ridicate de citochinină şi auxină, dar în proporţii egale, poate induce alături de organogeneză generarea de calus şi proliferarea acestuia.

Reacţia morfogenetică a fitoinoculului cultivat *in vitro* nu este determinată doar de balanţa hormonală introdusă în mediul nutritiv, ci este rezultatul interacţiunii dintre aceasta şi alţi factori, cum ar fi: conţinutul hormonal endogen, tipul de explant inoculat, natura explantului, starea fiziologică a acestuia etc.

Giberelinele sunt fitohormoni cu acţiune diferită comparativ cu auxinele şi citokininele. Ele au fost identificate pentru prima dată, în mediul de cultură al ciupercii *Gibberella fujikuroi*, fiind eliberate de miceliul acesteia. Sinteza în plante a acestui tip de hormoni se realizează în frunzele foarte tinere, în mugurii activi, în embrioni şi extremităţile rădăcinilor, circulând în plantă prin vasele liberiene. În cultura *in vitro* giberelinele sunt folosite în scopul inducerii (stimulării) creşterii în lungime a meristemelor caulinare.

După prepararea soluţiei nutritive, se stabileşte pH-ul acesteia, care se poate încadra între valorile 5,5 şi 5,8, în funcţie de tipul speciei, tipul de explant şi de cultură.

În general, în tehnologia neconvenţională de cultivare *in vitro* a diferitelor tipuri de explante vegetale se utilizează mediul nutritiv solid. Pentru a da consistenţă mediului, în soluţia nutritivă se introduce un *agent gelifiant*. Cel mai frecvent este utilizat agar-agarul – un polizaharid extras din algele roşii ale genului *Gelidium*. Cantitatea de agar introdusă în soluţia nutritivă diferă în funcţie de natura culturilor şi de tipul inoculilor, aceasta variind între 0,6 şi 1%, (după STREET, 1977). În

Scanned with OKEN Scanner

acelaşi scop se mai pot utiliza cu rezultate foarte bune şi alţi agenţi gelifianţi, cum ar fi: biogelurile, silicagelul sau gelurile de poliacrilamidă.

Ultima etapă în pregătirea mediilor nutritive o constituie sterilizarea acestora, care se realizează prin autoclavare la temperatura de 121^0 C şi presiunea de 1 atmosferă, timp de 20 – 30 minute.

Ca vase de cultură se pot utiliza diverse flacoane: erlenmayere, cutii petri, eprubete, vase speciale. Acestea sunt acoperite, în general, cu dopuri din vată, cu folie de staniol etc, şi sterilizate în etuvă timp de 1 - 2 ore la 160° C. În marile laboratoare din lume, se folosesc pentru cultivarea *in vitro* vase din material plastic, sterile şi de unică folosinţă.

b) Materialul vegetal

La baza tehnologiei de cultivare *in vitro* se află posibilitatea cultivării ţesuturilor şi celulelor plantelor pe medii sintetice şi capacitatea lor de a regenera organisme complete.

Materialul vegetal utilizat pentru iniţierea culturilor *in vitro* este în fond un fragment de plantă, care poartă numele de *explant*. Când se iniţiază cultura *in vitro*, în privinţa materialului biologic trebuie avută în vedere:

- *proveniența* acestuia:
  - specia, varietatea, genotipul, regimul ecologic;
  - originea şi natura ţesuturilor recoltate;
  - vârsta plantelor sau organelor donatoare de explante.
- *pregătirea* prealabilă a explantelor, dacă este cazul, prin aplicarea unor pretratamente nutriţionale, hormonale sau termice.
- *starea fiziologică* a plantelor donatoare.

Alegerea materilalului biologic este un prim factor important în inducerea reacţiei morfogenetice dorite a explantului, aceasta depinzând de interacţiunea cumulată şi a altor factori care stau la baza tehnologiei de cultivare *in vitro* (mediul de cultură, tipul şi concentraţia fitohormonilor, condiţiile de cultivare etc). Este cunoscut faptul că explante de acelaşi tip, recoltate însă de la soiuri diferite (în aceeaşi perioadă de vegetaţie) se pot comporta diferit, pe aceeaşi variantă de mediu nutritiv şi în condiţii identice de creştere a culturilor. La gerbera, de exemplu, multiplicarea prin intermediul explantelor de calatidiu, a înregistrat rezultate bune numai la soiurile cu flori roşii (CACHITA şi SAND, 2000). Chiar şi în cazul explantelor de acelaşi tip morfo-

Scanned with OKEN Scanner

funcţional, recoltate de pe aceeaşi plantă dar din locuri diferite, s-a constatat o mare diversitate de reacţie.

În 1990, RAICU a clasificat explantele în două mari categorii:

- explante ce conţin celule nediferenţiate - fiind reprezentate de apex, muguri, noduri sau meristeme.
- explante provenite din ţesuturi diferenţiate, ale căror celule sunt specializate.

Odată inoculate pe mediile nutritive, explantele urmează calea morfogenetică dictată de interacţiunea tuturor factorilor endogeni şi exogeni.

După alegerea materialului vegetal, urmează *sterilizarea* acestuia pentru eliminarea bacteriilor, ciupercilor şi a altor microorganisme. Procedeul de sterilizare nu trebuie să afecteze integritatea celulelor sau ţesuturilor vegetale. Aseptizarea ineficientă conduce la infectarea rapidă a mediilor de cultură cu bacterii şi mucegaiuri, alterându-le calitatea, determinând totodată şi deprecierea explantelor inoculate.

Metoda de sterilizare a explantelor trebuie adaptată în funcţie de tipul materialului biologic utilizat (seminţe, fragmente de tulpină, frunze etc.), de calitatea acestuia (frăgezimea lui) şi de intensitatea de acţiune a substanţei sterilizante.

În general, pentru realizarea acestei etape se procedează astfel:

- spălarea cu apă curentă sau imersarea în alcool etilic 70% (pentru cca 1 minut);
- imersia într-o soluţie sterilizantă (pentru un timp diferit, funcţie de factorii amintiţi);
- spălări repetate cu apă distilată sterilă.

Sunt cunoscute mai multe tipuri de agenţi sterilizanţi, a căror utilizare şi timp de acţiune diferă în funcţie de specie şi tipul de fitoinocul ce urmează a fi utilizat, (tabelul 4.2).

În urma experienţelor de tatonare privind metodele eficiente de sterilizare pentru diferitele tipuri de explante s-au stabilit o serie de procedee (tabelul 4.3).

În cadrul cercetărilor noastre am constatat că în situaţiile în care materialul biologic supus sterilizării nu rezistă la o imersare de durată mai mare în soluţie de clorură mercurică sau hipoclorit, rezultate bune se obţin prin imersarea timp de 3-5 minute în $HgCl_2$ (0,1%), urmată de imersarea timp de 7-10 minute în soluţie de cloramină-T (5%).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4.2. Agenţii chimici sterilizanţi utilizaţi în asepsizarea materialului biologic (după Street, 1973, citat de CACHIŢĂ, 2004)

Compusul chimic	Concentraţia utilizată	Durata sterilizării (minute)	Eficacitatea
Hipocloritul de calciu	9 - 10%	5 - 30	foarte bună
Hipocloritul de natriu	2 - 5%	5 - 30	foarte bună
Apa oxigenată	10 - 12%	5 - 15	bună
Apa bromată	1 - 2%	2 - 10	foarte bună
Azotatul de argint	1%	5 - 30	bună
Clorura mercurică	0,1 - 1%	2 - 10	satisfăcătoare
Antibiotice	4 - 50 mg/l	30 - 60	destul de bună

Tabelul 4.3. Procedee de sterilizare a diferitelor tipuri de explante (după Street, 1973, citat de CACHIŢĂ, 2004)

Tip material vegetal	Presterilizare	Sterilizare	Poststerilizare
Seminţe	Imersare în alcool etilic absolut 10 sec; spălare în apă distilată, sterilă	Imersare în hipoclorit Ca sau Na 10%, 20-30 minute, sau în apă bromată 1%, timp de 5 minute, fie în $HgCl_2$, 0,1 – 1% timp de 5 – 10 minute, ori în H_2O_2 15 – 30% timp de 10 – 20 minute, sau în fenol 5%	Spălări repetate de 5 ori în apă distilată sterilă
Fragmente de tulpină	Spălare în apă curgătoare şi clătire în alcool etilic absolut	Imersarea fragmentelor 15 – 30 minute în 2 – 5% hipoclorit de Ca sau Na (după caz, conconcentraţia până la 10%) ori în 15% H_2O_2 timp de o oră	Spălări repetate de 3 ori în apă distilată sterilă
Frunze	Ştergerea suprafeţei cu alcool etilic absolut	Imersare cca 1 minut, în $HgCl_2$ 0,1%	Spălări repetate de 5 ori în apă distilată sterilă
Flori (boboci, inflorescenţe, peduncul, rahis)	Imersare timp de 1 minut în alcool etilic $70 - 90^0$	Imersare 15 – 20 minute în hipoclorit de Ca sau de Na 2 – 5%	Spălări repetate de 5 ori în apă distilată sterilă
Fructe	Clătire în alcool etilic absolut	Imersare 10 minute în hipoclorit de Ca 2% sau hipoclorit de Na 2 – 5%	Spălări repetate de 3 - 5 ori în apă distilată sterilă
Organe de rezervă	Se spală prin frecare, în apă curgătoare	Imersare 20 – 30 minute în 2% hipoclorit de Ca sau de Na	Spălări repetate de 3 ori în apă distilată sterilă

Scanned with OKEN Scanner

c) Inocularea şi incubarea explantelor

După sterilizare, se recomandă inocularea imediată a explantelor pe mediile nutritive, pentru evitarea degradării acestora. Această operaţie se realizează la nişa cu aer steril, evitându-se astfel infectarea culturilor. Procedeul nu este dificil, mai ales în cazul inoculărilor pe medii solide, acesta constând în plasarea explantelor în vasele de cultură, pe mediile nutritive. În acest scop se folosesc pense sterile, care după fiecare operaţie de inoculare a unui vas, se sterilizează prin imersare în alcool şi flambare la un bec de gaz.

La plasarea fragmentelor vegetale pe mediile nutritive, trebuie să se ţină seama de fenomenul de polaritate. Fiecare fragment are o porţiune bazală – „radiculară", care are tendinţa de a forma calus ori rădăcini, şi una superioară – „foliară", la nivelul căreia apar muguraşi, (GAUTHERET, 1959).

În funcţie de tipul de fitoinocul utilizat se are în vedere numărul explantelor plasate per vas de cultură. Astfel, în fiecare vas inoculat densitatea fitoinoculilor nu trebuie să fie foarte mare, în vederea unei bune aprovizionări cu substanţe nutritive a acestora.

Pentru evitarea contaminării culturilor, după inocularea cu material vegetal, fiecare vas, cât şi folia acestuia, se flambează la becul de gaz.

După inoculare, flacoanele sunt trecute în camerele de creştere, unde sunt menţinute într-un regim climatizat programat. Odată cu aceasta începe perioada de incubare care variază în funcţie de tipul culturii, de specie şi tipul de explant utilizat. Creşterea şi dezvoltarea explantelor inoculate depinde foarte mult nu numai de substratul nutritiv, ci şi de condiţiile de lumină şi de temperatură existente în camerele de creştere. Cum cerinţele celulelor inoculate nu sunt identice, primele procese regenerative încep să se observe după una/două săptămâni de la inoculare în cazul speciilor ierboase. Când fitoinoculii sunt de natură lemnoasă, această reacţie este evidentă după cca 40-60 de zile, uneori chiar mai puţin, în funcţie de specie întrucât procesele regenerative sunt mai lente.

Pe parcursul perioadei de cultivare *in vitro*, în funcţie de scopul urmărit, se pot realiza culturi secundare prin transferul fitoinoculilor pe aceeaşi variantă de mediu sau pe noi formule hormonale.

Scanned with OKEN Scanner

d) Acomodarea vitroplantelor la mediul septic

Unul din scopurile principale ale acestei tehnologii este regenerarea de neoplantule. Regeneranţii obţinuţi pe diversele formule de mediu trebuie acomodaţi la mediul septic înaintea transplantării lor în câmp. Acomodarea se poate face prin trecerea lor în ghivece cu sol steril sau alte amestecuri de înrădăcinare, menţinute în incinte unde umiditatea aerului este ridicată, pentru a împiedica transpiraţia abundentă (fig. 4.1).

Fig. 4.1. Neoplantule acomodate

(a) în sistem hidroponic la *Mentha viridis* şi (b) în ghivece cu sol steril la *Digitalis purpurea*; regeneranţi transplantaţi în câmp la *Chrysanthemum balsamita* (e) şi la *Sedum fabaria* (d)

Noi practicăm cu succes sistemul hidroponic, cultivând regeneranţii în vase de sticlă sau material plastic pline cu apă, iar umiditatea ridicată a aerului o menţinem fie prin acoperirea lor cu alte vase asemănătoare, fie prin introducerea în incinte special amenajate în acest sens. Treptat, se reduce umiditatea aerului prin expunerea

Scanned with OKEN Scanner

regeneranților la mediul obișnuit, astfel încât după cca 10-14 zile ei sunt perfect acomodați și pot fi transferați fie în ghivece cu sol în amestec cu perlit și turbă, fie în seră, fie chiar în câmp (dacă condițiile agro-meteorologice permit). Procesul de acomodare a neoplantulelor la mediul septic este unul dificil pentru plante; el presupune o adaptare morfo-fiziologică a lor la un nou mod de viață și trebuie tratat cu mare atenție, pentru ca pierderile de material biologic să fie cât mai mici. Aceeași atenție sporită trebuie acordată și transplantării regeneranților în câmp, în sensul coordonării a două procese: producerea de regeneranți sincronizată cu perioada optimă de transfer a plantelor în câmp, care să evite astfel noi pierderi de material biologic produs *in vitro*.

4.1.2. Căi de morfogeneză în cultura *in vitro* la plante

Procesul de *morfogeneză* presupune diferențierea histologică a celulelor. Evoluția celulelor în acest proces este diferită, în funcție de capacitatea lor organogenetică sau embriogenetică. La nivelul celulelor vegetale în condițiile cultivării *in vitro*, fenomenele de morfogeneză se află sub controlul diferiților factori interni și externi. Din interacțiunea acestora, celulele explantelor suferă transformări, ale căror urmare se materializează fie în apariția unui calus (*calusogeneză* sau *calogeneză*), fie în generarea de organe - rădăcinițe și/sau tulpinițe (*rizogeneză* și respectiv *caulogeneză*), fenomen numit *organogeneză*. În alte situații, sub influența aceloraşi factori, are loc transformarea celulelor somatice în embrioni, care au o evoluție asemănătoare celor zigotici și pentru că derivă din celule ale corpului sunt numiți *embrioni somatici*. Fenomenul de apariție a embrionilor somatici din celulele explantelor cultivate *in vitro* se numește *embriogeneză somatică*.

Factorii implicați în determinarea reacției morfogenetice a explantelor cultivate *in vitro* sunt numeroși, iar dintre aceștia amintim:

a) factori interni:
- conținutul endogen în regulatori de creștere;
- starea de dezvoltare a materialului donor;
- vârsta și natura țesuturilor din care sunt recoltate explantele;
- competența morfogenetică a explantelor cultivate etc.

b) factori externi:
- tipul și concentrația regulatorilor de creștere introduși în mediul nutritiv;

Scanned with OKEN Scanner

- compoziţia mediului de cultură în săruri minerale şi compuşi organici;
- concentraţia şi raportul dintre unii componenţi ai mediului nutritiv (hormoni de creştere, compuşi organici - în special unii aminoacizi);
- unele extracte complexe de origine biologică sau cărbunele activ, prezente în mediul de cultură;
- factori fizici (temperatura, lumina etc, la care sunt incubate culturile *in vitro*).

4.1.2.1. Generarea de calus în culturile *in vitro* (calusogeneza, calogeneza)

În multe situaţii şi în mod natural, la nivelul zonelor traumatizate ale plantelor, apare o formaţiune tisulară cu rol în cicatrizarea rănilor, cunoscută sub numele de *calus*. Prezenţa acestei formaţiuni a fost observată şi la baza butaşilor plantaţi pentru înrădăcinare în zona de geneză a rădăcinilor adventive, sau în cazul ţesuturilor tumorale induse de diverşi agenţi. Calusul este constituit dintr-o masă informă de celule de natură parenchimatică, cu structură histologică uniformă. Când calusul este tânăr, celulele lui sunt nediferenţiate şi se divid activ.

În cultura *in vitro*, această structură poate fi generată din diverse tipuri de explante, cum ar fi: muguri, internodii, fragmente de frunze, meristeme, petale, antere, seminţe imature, rădăcini etc. Inoculate pe diverse formule hormonale de mediu, are loc dediferenţierea celulelor ţesuturilor respective, care devin astfel nespecializate, încep să se dividă activ şi dau naştere calusului. Inducerea calusului, viteza de creştere, aspectul şi culoarea lui sunt determinate în primul rând de tipul şi concentraţia regulatorilor de creştere din mediul nutritiv, dar şi de condiţiile de incubare a culturilor. În general, s-a constatat că inducerea şi proliferarea calusului este mult mai eficientă pe medii de cultură ce conţin 2,4-D, (CACHIŢĂ - COSMA, 1987), fapt confirmat şi în cadrul cercetărilor noastre pe diverse specii de plante.

Creşterea calusului în condiţii *in vitro*, este considerată nedefinită în timp, deoarece acesta poate fi separat în fragmente mai mici, ce sunt apoi cultivate pe medii nutritive proaspete. Pentru păstrarea viabilităţii celulelor calusale, se recomandă ca repicarea calusului să se facă la un interval de 2-6 săptămâni (în funcţie de natura ţesuturilor de origine, de

Scanned with OKEN Scanner

condițiile de cultivare și de viteza de proliferare a celulelor). Dacă subcultivarea calusului nu se face în timp util, se produce îmbătrânirea culturii, masa tisulară schimbându-și culoarea normală din crem, gălbui, galben-verzui ori verde, în cenușie, roșcată sau galben-brună. Uneori, în anumite condiții de incubare și în funcție de specie și de explantul inițial, în sucul vacuolar al celulelor se formează și se acumulează antociani, pigmenți care conferă calusului culoarea roșietică sau vișinie.

După o perioadă de cultură, în masa de celule nediferențiate a calusului poate să apară o citodiferențiere spontană, care constă în apariția unor centri meristematici. În funcție de natura substratului de cultură (regulatorii de creștere prezenți în mediul nutritiv), de specie, genotip și de condițiile de incubare, aceștia pot fi organogeni sau embriogeni. Morfologia calusului se poate astfel schimba, din el formându-se organe (rădăcini și/sau tulpini) sau embrioni ce dau naștere la plantule. În foarte multe cazuri calusul poate rămâne nediferențiat din punct de vedere celular, el proliferând fără a se metamorfoza.

În funcție de aspectul, originea și răspunsul calusului în cultura *in vitro*, CACHIȚĂ - COSMA (1984) a delimitat mai multe tipuri de calus:

a) după *aspect*, calusul poate fi:

- *compact* sau *dur*, la care celulele sunt strâns conectate (legate) între ele;
- *lax* sau *friabil*, caz în care celulele lui pot fi separate cu ușurință, fie în fragmente granulate de mărimi diferite (calus *grunjos*), fie în formațiuni tisulare fine (calus *spumos*).

Consistența și friabilitatea masei de calus depind de specie, natura explantelor și fitohormonii utilizați în mediul de cultură.

b) după *originea* lui, calusul poate fi:

- *primar*, când este obținut din inoculul inițial, de exemplu din sămânța imatură. Acesta conține o populație de aproximativ 50.000 de celule.
- *secundar*, când provine din calusul primar, care după o perioadă de cultivare pe mediul de inducere este transferat pe un mediu proaspăt de cultură.

Din punctul de vedere *al răspunsului în cultură*, calusul poate fi de două categorii și anume:

- calus de tip *regenerativ* sau *embriogen*, care dă naștere la noi plante. Acesta este dens, translucid sau opac, are culoarea alb-

Scanned with OKEN Scanner

lăptoasă, gălbuie sau galbenă-verde; prezintă zone compacte, cu celule nediferențiate, capabile de a genera embrioni, ce vor putea da naştere ulterior la plante complete. Viteza de creştere a calusului embriogen este lentă.

- calus de tip *neregenerativ* sau *neembriogen* care generează rădăcini, rar muguraşi, dar niciodată plante. Este alcătuit dintr-o masă cristaslină, transparentă, de celule de culoare albă, brunie sau verde. Are o consistență mai laxă, şi este mai friabil decât tipul precedent, desfăcându-se uşor în pachete de celule. Față de calusul regenerativ, calusul neembriogen se caracterizează printr-o proliferare ridicată, prezentând creştere luxuriantă, (CACHIȚĂ-COSMA, 1984).

Clasificarea potrivit acestui ultim criteriu în: regenerativ = embriogen şi neregenerativ = neembriogen, este discutabilă. A fost scăpat din vedere un tip frecvent de calus, care nu generează embrioni, dar care poate genera lăstari sau rădăcini, care este deci *organogen*. Noi considerăm că în categoria calusului regenerativ trebuie inclus şi calusul organogen, iar în categoria celui neregenerativ doar calusul care nu diferențiază, care nu formează nici embrioni somatici, nici lăstari, nici rădăcini. Din punctul nostru de vedere, calusul neregenerativ poate fi şi compact, de culoare albicioasă, verde, vernil, crem, brun-verzuie etc; în acest caz viteza lui de proliferare este mai scăzută decât în cazul celui friabil. Adeseori calusul neregenerativ poate fi de consitență moale (în special cel provenit din rădăcini). De altfel, calusul obținut din rădăcini inoculate pe anumite formule de mediu, este de regulă neregenerativ. În cadrul experiențelor noastre doar într-un singur caz am obținut calus caulogen din rădăcini, această calitate avînd calusul generat din rădăcini la *Sedum fabaria*. Am constatat de asemenea că rizogeneza *via calus* este un fenomen mult mai frecvent decât caulogeneza via calus că, în general, calusul caulogen este friabil, dar format din agregate de celule mai strâns legate între ele (mai tare, sfărâmicios). În figura 4.2 prezentăm câteva tipuri de calus evidențiate de noi în cercetările efectuate pe o serie de plante medicinale şi aromatice.

Scanned with OKEN Scanner

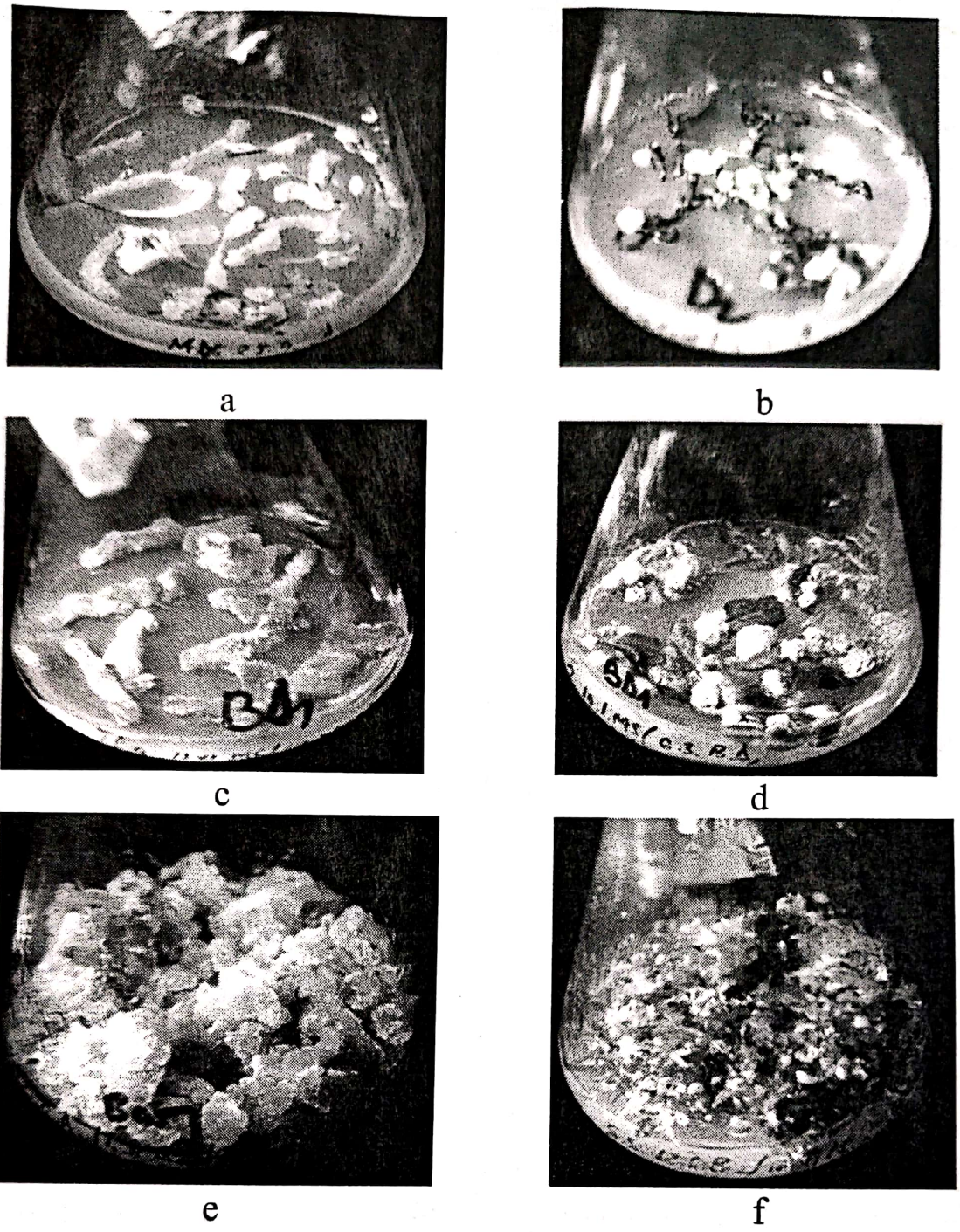


Fig. 4.2. Diverse tipuri de calus

a) calus friabil (moale) de rădăcină la *Mentha viridis;* b) calus compact de rădăcină la *Vinca minor;* c) calus compact de internod la *Trigonella foenum-graecum;* d) calus compact de frunză la *Ocimum basilicum*; e) calus friabil (spumant de nod) la *Lavandula angustifolia;* f) calus embriogen la *Digitalis purpurea*

Există o mare variabilitate a plantelor şi sub raportul generării calusului. Dacă, în general, formarea calusului este legată de prezența în mediul nutritiv a auxinelor, sunt specii care generează calus chiar şi pe

Scanned with OKEN Scanner

mediul MS lipsit de hormoni, aşa cum am observat la levănţică şi angelică. După cum, la *Sedum hybridum*, chiar în prezenţa unor cantităţi apreciabile de 2,4-D, IAA, IBA sau NAA (2 mg/l), nodurile şi vârfurile de lăstari nu au generat calus ci neoplantule, dovadă a importanţei deosebite a factorului specificitate.

Sunt specii la care fenomenul de caulogeneză *via calus* este un fenomen foarte eficient, cum este cazul la degeţelul roşu sau levănţică, şi specii la care regenerarea de lăstari din calus este un fenomen extrem de dificil, cum e cazul la angelică. Sunt specii la care subcultivarea calusului nu este posibilă, cum este cazul la mentă, roiniţă, calapăr etc, şi specii ca levănţica şi degeţelul roşu, la care proliferarea calusului poate fi menţinută timp nedefinit prin transferul pe anumite formule de mediu. Sunt diferenţe între specii şi în privinţa menţinerii capacităţii caulogenetice în funcţie de numărul de subcultivări succesive ale calusului, în sensul că la unele plante această calitate poate fi păstrată timp îndelungat (de exemplu - levănţica), în timp ce la altele se pierde după 1-2 transferări (rosmarinul, de exemplu), (date personale nepublicate). Organogeneza indirectă, via calus, va fi prezentată într-un capitol distinct.

Mediile de cultură optime pentru obţinerea de calus regenerativ s-au dovedit a fi cele sărace în azot (redus sau oxidat), cu pH 5,5 (BADEA şi SĂNDULESCU, 2001). NABORS (citat după CACHIŢĂ-COSMA, 1984) a constatat tendinţa calusului embriogen de a se transforma în calus neembriogen, procesul fiind ireversibil. Pierderea capacităţii calusului de a genera rădăcinite, tulpinite sau embrioni somatici este încă neexplicată fiziologic. Capacitatea calusului de a regenera plante poate fi menţinută timp îndelungat la unele plante, dacă repicarea acestuia se face în condiţii optime. La tutun, de exemplu, capacitatea regenerativă a calusului a fost păstrată chiar şi după cinci ani de repicare. La dicotiledonate calusul este indus mult mai uşor ca la gimnosperme sau monocotiledonate, cele din urmă prezentând capacitate regenerativă slabă.

Aşa cum menţionam anterior, capacitatea embriogenă a calusului depinde de genotip, de tipul şi concentraţia regulatorilor de creştere din mediul nutritiv, precum şi de condiţiile de cultivare. La căpşun, de exemplu, în funcţie de genotip şi de tipul de explant utilizat, s-a observat o reacţie diferită în privinţa procesului de regenerare, fie prin

Scanned with OKEN Scanner

embriogeneză somatică, fie prin organogeneză indirectă, (NISHI şi OOSAWA, 1973; WANG et al., 1984; MILLER şi CHANDLER, 1990; NEHRA et al., 1990, citaţi după POPESCU şi ISAC, 1993). De asemenea, în cazul a doi cultivari (*Aiko* şi *Premial*) de *Fragaria ananassa* Duch. a fost evidenţiată influenţa concentraţiei citokininelor în mediul de cultură asupra frecvenţei lăstarilor proveniţi din calusul de frunză sau de peţiol, (CACHIŢĂ-COSMA, 2000).

Calusul poate fi folosit şi în studiul reacţiei celulei vegetale la diverse substanţe sau la diferite condiţii de cultură. Se pot efectua experienţe de fiziologie vegetală pe calus, pentru elucidarea unor aspecte referitoare la: creşterea (influenţată de anumiţi fitohormoni), respiraţia, morfogeneza, reacţia la pesticide, la ioni grei, noxe, testarea variabilităţii celulare, formarea produşilor primari sau secundari de metabolism, cercetări de enzimologie etc.

În timpul cultivării *in vitro* a calusului (mai cu seamă în condiţiile subcultivării repetate, timp îndelungat), în celulele lui pot să apară o serie de fenomene ca: endoreduplicări, mitoze anormale, poliploidii, aneuploidii, restructurări cromosomiale etc, care supun celulele calusului la o evoluţie genetică rapidă. Fenomenele menţionate determină apariţia variabilităţii somaclonale şi permit obţinerea de noi genotipuri de plante. Totodată, culturile de calus pot fi supuse acţiunii agenţilor mutageni sau unor factori de stres pentru amplificarea variabilităţii celulelor şi implicit a regeneranţilor, fapt ce asigură izolarea unor linii celulare sau a unor genotipuri noi de plante de interes economic.

4.1.2.2. Organogeneza *in vitro*

Organogeneza în culturi *in vitro* este un proces extrem de complex, care constă în generarea de rădăcini - fenomen numit *rizogeneză* şi/sau tulpini - fenomen numit *caulogeneză*, (fig. 4.3). Direcţia dezvoltării organogenetice depinde de o serie întreagă de factori cum ar fi: conţinutul endogen de fitohormoni din explante, aportul exogen de hormoni, aprovizionarea cu săruri minerale şi cu unele substanţe organice în substratul nutritiv, regimul de iluminare a plantelor, temperatura din camera de cultură etc.

De menţionat este faptul că aptitudinea organogenetică a cormofitoinoculilor este înscrisă în progamul genetic al celulelor. Formarea de tulpini şi/sau rădăcini poate avea loc direct din celulele

Scanned with OKEN Scanner

explantului (*organogeneză directă*) sau din masa de calus care a luat naştere prin dediferenţierea celulelor explantului (*organogeneză indirectă*).

Obţinerea calusului în cultura *in vitro* nu este însă de dorit atunci când se urmăreşte multiplicarea clonală a unor genotipuri, ci doar în cazul când se intenţionează specularea variabilităţii somaclonale care însoţeşte regenerarea de plante sau lăstari *via calus*, sau în cazul când acest calus conţine substanţe de interes farmaceutic şi are o capacitate înaltă de multiplicare a celulelor, care să permită obţinerea de biomasă (fie prin cultivarea pe medii solide, fie în culturi de celule în suspensie) ce poate fi exploatată economic.

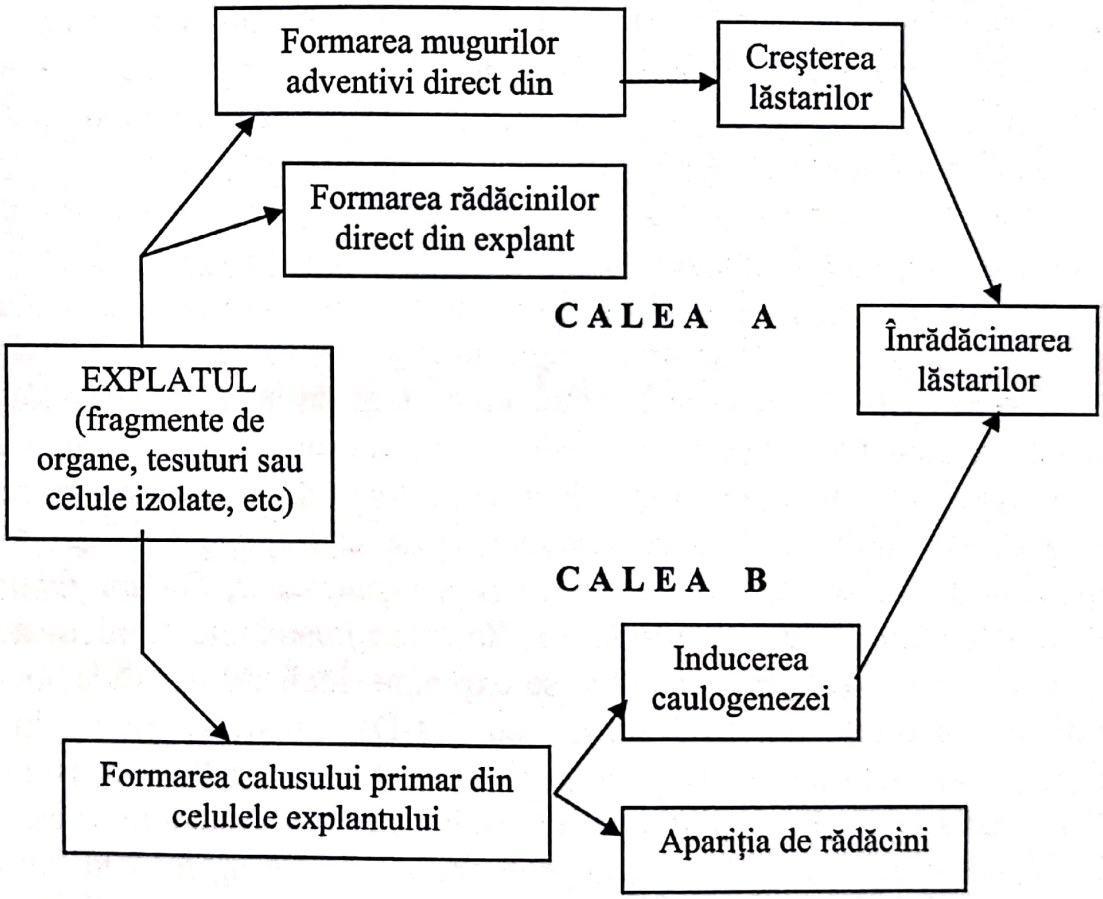


Fig. 4.3. Reprezentarea schematică a regenerării de plante prin organogeneză

A) calea organogenezei directe; B) calea organogenezei indirecte (*via calus*)

A. *Rizogeneza in vitro*

Rizogeneza (sau neoformarea de rădăcini) este un fenomen de organogeneză foarte frecvent întâlnit în multiplicarea vegetativă, implicit

Scanned with OKEN Scanner

în cultura *in vitro*. Manifestarea acestui fenomen, ca de altfel a proceselor de organogeneză, depinde într-un grad foarte important de: originea explantului (specia, vârsta plantei donor, genotipul), natura şi mărimea explantului, starea fiziologică a celulelor din explant etc. Totodată şi fitohormonii (mai ales auxinele endogene şi exogene) au un rol extrem de important în exprimarea acestui caracter. Un efect cert asupra rizogenezei exercită şi regimul de lumină şi anume: o intensitate slabă a acesteia, sau expunerea pentru scurt timp la lumină (600 lucşi, mai puțin de o oră /zi) stimulează procesul de rizogeneză. Temperatura optimă pentru inducerea acestui fenomen este apreciată la 26^0C. Uneori însă, se recomandă practicarea unei alternanțe între o temperatură scăzută (5^0C - 15^0C) şi una ridicată (23 - 26^0C), în prezența luminii, a unei auxine şi a unui mediu bogat în glucide, (BADEA şi SĂNDULESCU, 2001). Noi considerăm că temperatura, în limite normale, nu exercită un rol foarte important în rizogeneză.

În cele mai frecvente cazuri, când este vorba de explante constând în cotiledoane, noduri, vârfuri de lăstari, formarea rădăcinilor (ca şi la butaşi) este localizată polar. Rădăcinile se formează la polul radicular al explantului, în timp ce generarea mugurilor este localizată la polul foliar.

Aşa cum precizam la începutul capitolului, fenomenul de rizogeneză este unul foarte frecvent în cultura *in vitro*. În cercetările noastre pe diverse plante medicinale am constatat că rizogeneza indirectă *via calus*, este mult mai bine reprezentată decât caulogeneza indirectă *via calus*. La multe specii, cum ar fi *Digitalis purpurea*, *Sedum fabaria*, *Ocimum basilicum*, *Melisa officinalis*, *Brassica juncea* etc, am constatat că țesutul calusal (obținut din diverse explante, inclusiv din rădăcini, pe medii suplimentate cel mai adesea cu 2,4-D) transferat pe medii cu auxine (în special cu NAA) sau chiar pe mediul de inducere a calusului, a generat rădăcini fie în mediul nutritiv, fie la suprafața calusului, (vezi fig. 4.4) De asemenea, inocularea frunzelor unor specii (*Digitalis purpurea*, *Chrysanthemum balsamita*, *Stachys sieboldii*) pe medii nutritive suplimentate cu anumite auxine (în special cu NAA) a dus la generarea de rădăcini bine dezvoltate, mai ales de la nivelul pețiolului.

Fenomenul de generare a rădăcinilor din calus sau alte explante ar putea fi speculat în practică în cazul când sinteza anumitor principii active în plante este specifică rădăcinilor.

Scanned with OKEN Scanner

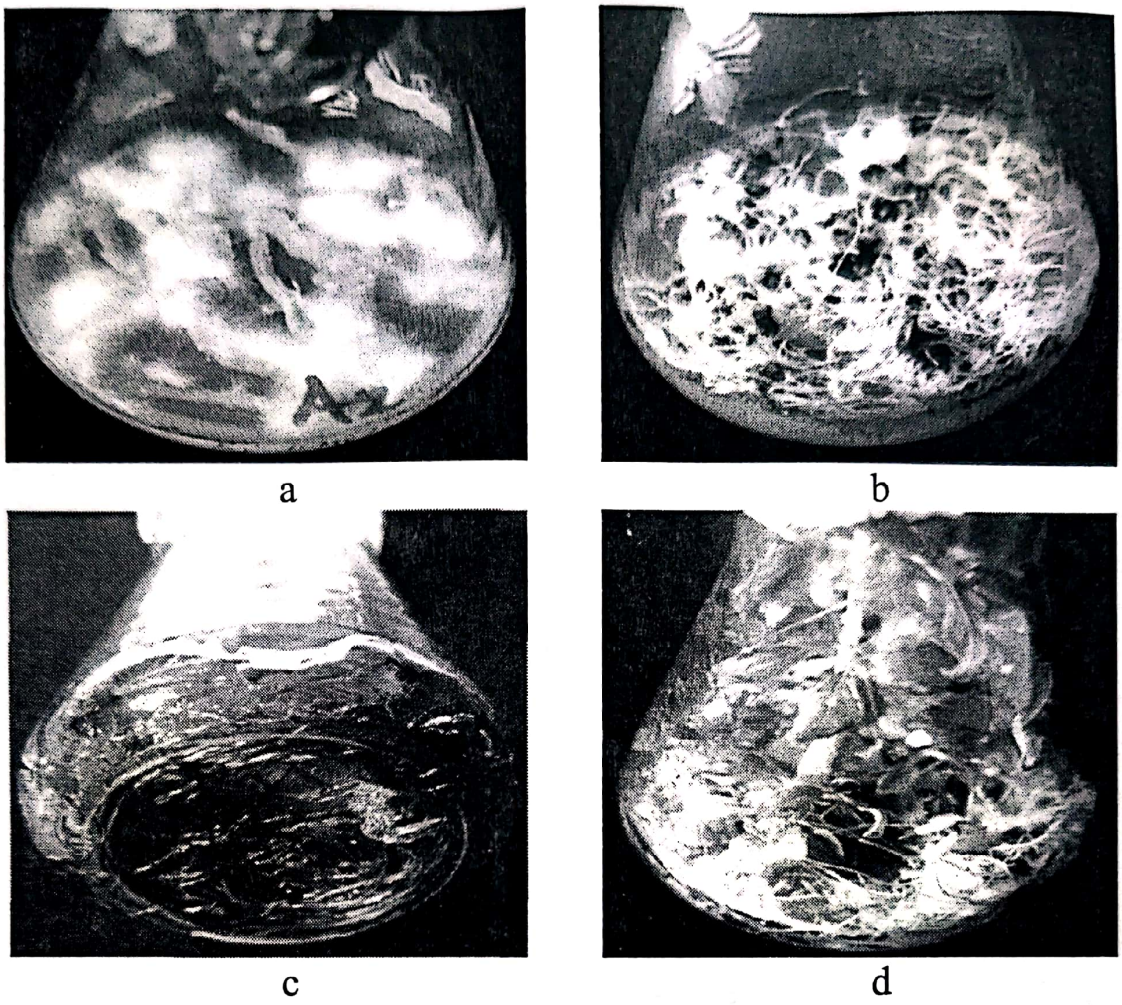


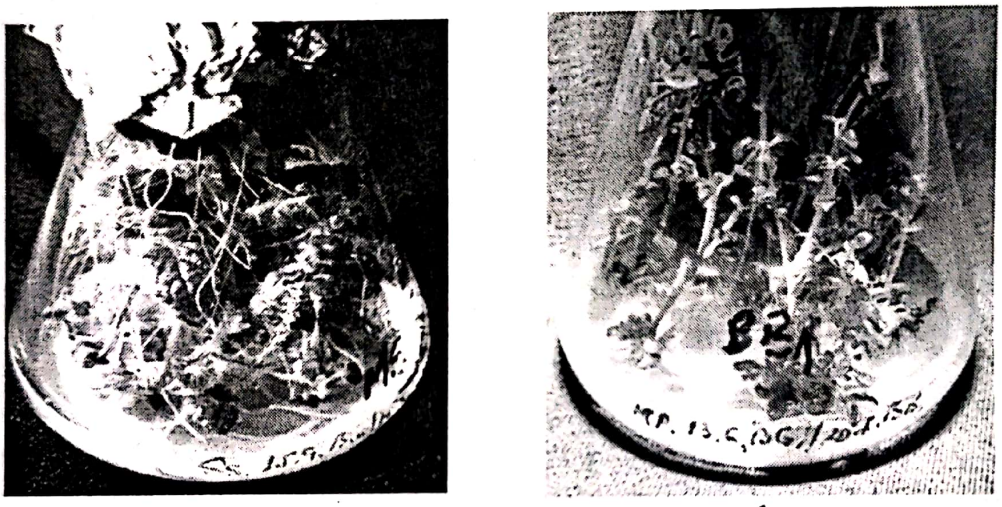
Fig. 4.4. Rizogeneză indusă din diverse tipuri de explante
a) rețea de rădăcini dezvoltată din calus de hipocotil la *Brassica juncea;* b) rețea de rădăcini din calus de nod la *Ocimum basilicum*; c) rădăcini dezvoltate din peţiolul frunzelor de *Chrisanthemum balsamita*; d) rădăcini dezvoltate din nodul bazal la neoplantule de *Ocimum basilicum*

Se întâlnesc şi cazuri în care explantele nu posedă capacitate rizogenetică, dar aceasta poate fi dobândită în mod secundar în urma microcultivării sau sub influenţa interacţiunii unor factori. Cel mai mare efect în formarea şi dezvoltarea rădăcinilor se pare că îl au regulatorii de creştere din categoria auxinelor. SPANJENRSBERG şi GAUTHERET (1963) menţionează necesitatea prezenţei în mediul nutritiv a NAA (acidul naftilacetic) ca factor declanşator al rizogenezei. Cu toate acestea, se pare că cea mai eficientă auxină în generarea rădăcinilor este IAA (acidul 3-indolilacetic), care este auxina nativă ce se acumulează în concentraţii apreciabile chiar la locul de formare şi apoi circulă către

Scanned with OKEN Scanner

zona de inițiere a meristemelor ce vor genera rădăcini. Poate așa stau lucrurile în mod natural, dar în cazul culturilor *in vitro* și noi considerăm ca cea mai eficientă auxină în inducerea rizogenezei este NAA. Aportul exogen de auxină poate determina formarea rădăcinilor adventive.

Sub acest aspect, specificitatea materialului biologic are din nou rolul ei foarte pregnant. Investigațiile noastre au evidențiat faptul că în cazul unor specii (*Stachys sieboldii*, *Mentha piperita*, *M. viridis* etc) generarea de rădăcini adventive *in vitro* este un fenomen frecvent chiar în absența auxinelor în mediul nutritiv, care se amplifică prin suplimentarea acestuia cu auxine, (fig. 4.5).



a b

Fig. 4.5. Rădăcini adventive dezvoltate din nodurile superioare ale tulpinii neoplantulelor de *Stachys sieboldii* (a) și *Mentha piperita* (b)

În cazul culturilor *in vitro* la specia *Ocimum basilicum* am observat că pe unele formule hormonale și chiar pe mediul MS lipsit de hormoni apar frecvent rădăcini adventive nu numai de la nivelul nodurilor aeriene, ci și de la nivelul internodurilor.

ROȘU și colaboratorii (1985) menționează că efectul auxinei este important doar la prima introducere a acesteia în substratul nutritiv. Dacă se prelevează din cadrul rădăcinilor neoformate un butaș și se retratează cu auxină, nu mai are loc apariția rizogenezei. De aici supoziția că există un factor rizogen în celulele din zona de formare a rădăcinilor, factor epuizat ori inactivat în cadrul primului tratament.

Scanned with OKEN Scanner

La plopul tremurător, JACQUIT (1980) a observat suşe de inoculi cu capacitate rizogenă şi suşe care nu formează rădăcini decât dacă se grefează pe ele ţesut cu capacitate rizogenă. Se consideră astfel că în afară de auxinele introduse în substratul de cultură, ar exista substanţe naturale cu proprietăţi rizogene (rizocaline), care pot migra din ţesutul capabil de rizogeneză în ţesutul inapt de a forma rădăcini. La aceeaşi specie s-a observat că după repicări succesive, capacitatea rizogenă a ţesuturilor se poate schimba, deşi condiţiile de cultură sunt aceleaşi, iar celulele îşi menţin capacitatea proliferativă. În altă situaţie, la o suşă de eucalipt, la o primă repicare nu s-au obţinut rădăcini, în timp ce după 7-8 pasaje s-a declanşat procesul de rizogeneză.

Deşi se ştiu multe despre condiţiile ce induc sau favorizează neoformarea de rădăcini în culturile *in vitro*, nu se cunosc încă în detaliu mecanismele intime ale procesului de rizogeneză. Dovadă şi faptul că la numeroase specii rizogeneza poate fi indusă prin cultivarea explantelor doar pe mediul nutritiv lipsit de regulatori de creştere, ceea ce înseamnă că nivelul fitohormonilor endogeni din explante este suficient pentru a declanşa procesul. Cum însă, e mai dificil de răspuns.

B. *Caulogeneza in vitro*

Prin *caulogeneză* se înţelege fenomenul de formare, creştere şi dezvoltare a tulpinilor. În condiţiile cultivării *in vitro* acest fenomen presupune apariţia şi dezvoltarea lăstarilor terminali, axilari, adventivi sau neoformaţi pe un calus. Lăstarii proveniţi din calus în culturi *in vitro* pot fi consideraţi un tip particular de lăstari adventivi, numiţi şi „lăstari de neoformare", (MARGARA, 1982). Lăstarii neoformaţi *in vitro* pot apărea direct pe explantul iniţial, fenomenul fiind cunoscut sub numele de *caulogeneză directă*, sau la nivelul calusului dezvoltat din explantul iniţial, caz în care se vorbeşte de *caulogeneza indirectă*.

Apariţia centrilor meristematici şi respectiv neoformarea de muguraşi din calus, sunt esenţiale când se urmăreşte multiplicarea unei plante sau a unui genotip. Acest proces este stimulat în primul rând de prezenţa citokininelor în mediul nutritiv. Frecvent însă, fenomenul este indus şi în condiţiile asocierii citokininelor cu auxinele, reuşita neoformării de muguraşi în acest caz depinzând de asigurarea unui anumit raport auxine/citokinine. Inducerea caulogenezei *via calus* este influenţată şi de alţi factori cum ar fi: specia în cauză, genotipul, proveniența şi natura explantului etc. De exemplu, la *Catharanthus*

Scanned with OKEN Scanner

roseus s-a constatat că pe mediul suplimentat cu BAP (1-2 mg/l) se manifestă fenomenul de lăstărire multiplă, în timp ce pe mediul cu BAP şi auxină (0,5-1mg/l NAA, IAA sau IBA) s-a evidenţiat acelaşi fenomen, dar procesul a avut o evoluţie mai lentă, iar lăstarii au fost mai fragili, (GHIORGHIŢĂ şi PRISECARU, 1995).

Întrucât explantele răspund diferit în condiţii identice de cultivare, se încearcă echilibrarea conţinutului endogen de fitohormoni cu adaosul de regulatori de creştere în substratul de cultură. Astfel, uneori se poate declanşa caulogeneza reducând concentraţia de auxină. În alte situaţii, s-a constatat că este posibilă favorizarea formării de muguraşi prin adăugarea în substratul de cultură a unor compuşi fenolici, care par să reducă nivelul endogen de auxină prin stimularea activităţii IAA-oxidazei, (LEE şi SKOOG, 1965 – la tutun). Se cunosc şi exemple de reacţie inversă. Astfel, SASTRI (1963) a observat că aportul de auxină în culturile *in vitro* de *Armoracia rusticana* favoriza neoformarea de muguraşi, în timp ce sporirea conţinutului în kinetină inhiba caulogeneza.

Kinetina, dintre citokinine, este cel mai frecvent utilizată în inducerea caulogenezei. S-a constatat însă că şi BA (benziladenina) poate fi folosită cu succes în acest scop. Procesul poate fi stimulat şi de unele substanţe din clasa auxinelor, cum ar fi IAA (acidul indolilacetic), NAA (acidul naftilacetic) şi IBA (acidul indolilbutiric). Formarea de lăstari este influenţată şi de gibereline. în funcţie de natura materialului vegetal, dar rareori efectul a fost unul stimulator. În general, giberelinele inhibă inducerea caulogenezei, însă facilitează uneori creşterea ulterioară a meristemelor, (MARGARA, 1969). Din păcate, sub acest aspect nu există reguli general valabile. Adeseori, fiecare specie, şi chiar experienţă de iniţiere, reprezintă un caz unic, iar reacţia explantelor la balanţa hormonală din substrat variază mult, în dependenţă de tipul materialului vegetal utilizat, starea lui fiziologică, stadiul dezvoltării ontogenetice etc.

În cazul inducerii caulogenezei din calus se obţin rezultate favorabile prin repicarea şi subcultivarea succesivă a acestuia, iniţial pe un mediu bogat în 2,4-D (10^{-7}M sau 10^{-6}M), sau în prezenţa unei auxine cu efect mai redus, dar folosită în concentraţie mare (NAA sau IBA, 10^{-6}-10^{-5}M), eventual asociată cu o citokinină în concentraţie medie. Subcultivat pe un mediu cu aport scăzut de auxină şi concentraţie mare de citokinină, calusul poate genera cu succes muguri de lăstari

Scanned with OKEN Scanner

(ANGHEL et al., 1985). YAMAGUCHI şi NAKAJIMA (1974) au constatat o acţiune stimulatoare a acidului abscisic (ABA) asupra caulogenezei *in vitro* la cartof.

În privinţa influenţei factorilor externi (lumină, temperatură, compoziţia mediului de cultură etc) asupra caulogenezei *in vitro* opiniile sunt divergente. Acţiunea acestora ar depinde foarte mult de tipul inoculilor şi de etapele parcurse anterior. Temperatura recomandabilă pentru desfăşurarea optimă a proceselor de caulogeneză este de 25^0C.

Sunt păreri că neoformarea de mugurași nu pare a fi un proces dependent de fotoperiodă. Se cunosc puține cazuri în care caulogeneza să fi fost favorizată de o anumită fotoperioadă. O astfel de relație s-a observat de exemplu la *Pelargonium*, unde caulogeneza a fost promovată de o fotoperioadă mai lungă. Totuşi, observaţiile efectuate pe numeroase specii au evidenţiat că lumina nu este un factor decisiv în inducerea caulogenezei *in vitro*. La cicoare, de exemplu, în experimentele de inducere a lăstăririi pornind de la explante foliare, lumina a exercitat o influenţă nefavorabilă asupra caulogenezei numai în primele zile după inoculare, (LEGRAND, 1972). La lalea, apariţia mugurașilor pornind de la fragmente de inflorescenţe nu are loc decât în condiţii de obscuritate, (BANCILHON, 1974). În alte situaţii (la gerbera şi frezie, de exemplu) după parcurgerea unei perioade de întuneric, inoculii florali trecuţi la lumină continuă au generat mugurași. În experienţele noastre la levănţică (date nepublicate) am constatat că lumina nu este un factor decisiv în inducerea caulogenezei din calus, formarea de muguri şi lăstari fiind posibilă atât la lumină cât şi la întuneric (în acest din urmă caz lăstarii fiind albi, dar trecuţi la lumină capătă culoare verde).

Cercetările au arătat că de multe ori inducerea mugurilor necesită un anumit tip de explant şi s-a constatat că cea mai bună reacţie în generarea de lăstari se pare că o au explantele prelevate din embrioni, din plantule sau din inflorescenţe. Reacţia variază foarte mult cu specia, de aceea este dificil de apreciat care sunt organele cele mai potrivite pentru a constitui donatorii de explante, astfel încât să se obţină o înmugurire satisfăcătoare.

Numeroasele experimente de micropropagare efectuate pe unele specii de plante medicinale şi aromatice, au relevat că inducerea neoformării de mugurași, intensitatea acestui fenomen, aspectul lăstarilor şi capacitatea lor de supravieţuire etc , depind de o multitudine de factori,

Scanned with OKEN Scanner

cum ar fi: specia în cauză, genotipul, stadiul de dezvoltare al plantelor donor, tipul explantului inoculat şi mai ales tipul şi concentraţia regulatorilor de creştere introduşi în mediul de cultură, (GHIORGHIŢĂ şi ONISEI, 1990). În figura 4.6. prezentăm două exemple de caulogeneză indirectă via calus induse de noi la levanţică şi muştarul brun.

a b

Fig. 4.6. Generarea de lăstari via calus la *Brassica juncea* (a) şi la *Lavandula angustifolia* (b)

La monocotiledonate capacitatea caulogenetică *in vitro* (via calus) este mai slab reprezentată ca la dicotiledonate, faptul datorându-se diferenţei de metabolism sau structurii anatomice diferite (de exemplu, la monocotiledonate este absent cambiul intrafascicular continuu).

Adeseori, această capacitate la nivelul calusului se pierde în timp, pe măsura practicării unor repicări succesive, fenomen observat mai ales la grâu, (PRISECARU şi GHIORGHIŢĂ, 1995). O diferenţă între calusul de dicotiledonate şi cel de monocotiledonate este că acesta din urmă dovedeşte o aptitudine deosebită de a forma rapid meristeme radiculare, fapt care provoacă probabil o dezorganizare a calusului, în direcţia defavorizării caulogenezei. Sunt situaţii în care caulogeneza se induce prin repicări succesive; alteori dimpotrivă, prin subcultivare se pierde această capacitate. Nu se ştie exact cărui fapt se datorează pierderea capacităţii organogenetice. Se consideră că un rol important l-ar avea nu numai genotipul, ci şi o serie de factori fiziologici.

Aspecte ale organogenezei au fost descrise în numeroase lucrări de culturi *in vitro* la plante. S-a constatat că există tipuri de explante care generează uşor atât rădăcini cât şi tulpini. La crizanteme, explantele constând în meristeme, fragmente caulinare diverse (nod, internod, teacă,

Scanned with OKEN Scanner

peţiol, peduncul floral etc.) sau rădăcini, diferenţiază uşor muguraşi, (LAZĂR şi CACHIŢĂ - COSMA, 1985). La alte specii, explantele prelevate de pe aceeaşi plantă dovedesc aptitudini organogene diferite. Astfel, la hortensie, meristemul şi explantele nodale generează plantule complet conformate cu rădăcini firave, slab dezvoltate; explantele constând în fragmente de internoduri plasate pe lungimea lor deasupra mediului nutritiv au generat rădăcini, fără a da naştere la muguraşi. Atât la hortensie cât şi la garoafe, se întâlneşte fenomenul de geotropism negativ al rădăcinilor, în sensul că în loc să se înfigă în mediul de cultură, frecvent se orientează înspre deschiderea flaconului, (LAZĂR şi CACHIŢĂ - COSMA, 1985).

În experienţele noastre am constatat că regenerarea de neoplantule *in vitro* plecând de la noduri, vârfuri de lăstari, mici lăstari sub formă de rozetă, cotiledoane (caulogeneză directă) este posibilă la numeroase specii de plante medicinale şi aromatice: *Vinca minor, Digitalis purpurea, D. lanata, Stachys sieboldi, Withania somnifera, Gentiana lutea, Sedum hybridum, Sedum fabaria, Lavandula angustifolia, Mentha viridis, M. piperita, Melissa officinalis, Ocimum basilicum*, (fig. 4.7). Organogeneza indirectă *via calus* s-a dovedit o misiune mult mai dificilă şi a fost posibilă doar la *Digitalis purpurea*, *Lavandula angustifolia*, *Sedum fabaria* şi *Stachys sieboldii*. Embriogeneză somatică am reuşit să inducem doar la degeţelul roşu, deşi a fost semnalată şi la levănţică, din speciile abordate de noi, (GHIORGHIŢĂ et al., 1995, 1998, 2003).

Pentru stimularea proceselor organogene, s-au pus la punct unele tehnici suplimentare, cum ar fi impulsurile electrice. Astfel, RATHORE şi GOLDSWORTHY (1985) au raportat o creştere de cinci ori a numărului de lăstari apăruţi pe un calus de *Nicotiana tabacum*, prin trecerea unui curent electric de 1-2 microamperi (interpus între mediul de cultură şi calus). Rezultate similare s-au obţinut şi la grâu. Explicaţia ar fi capacitatea curentului electric de a influenţa polaritatea fiziologică a celulelor. Se consideră că această tehnică poate fi aplicată la speciile recalcitrante la organogeneză.

Scanned with OKEN Scanner

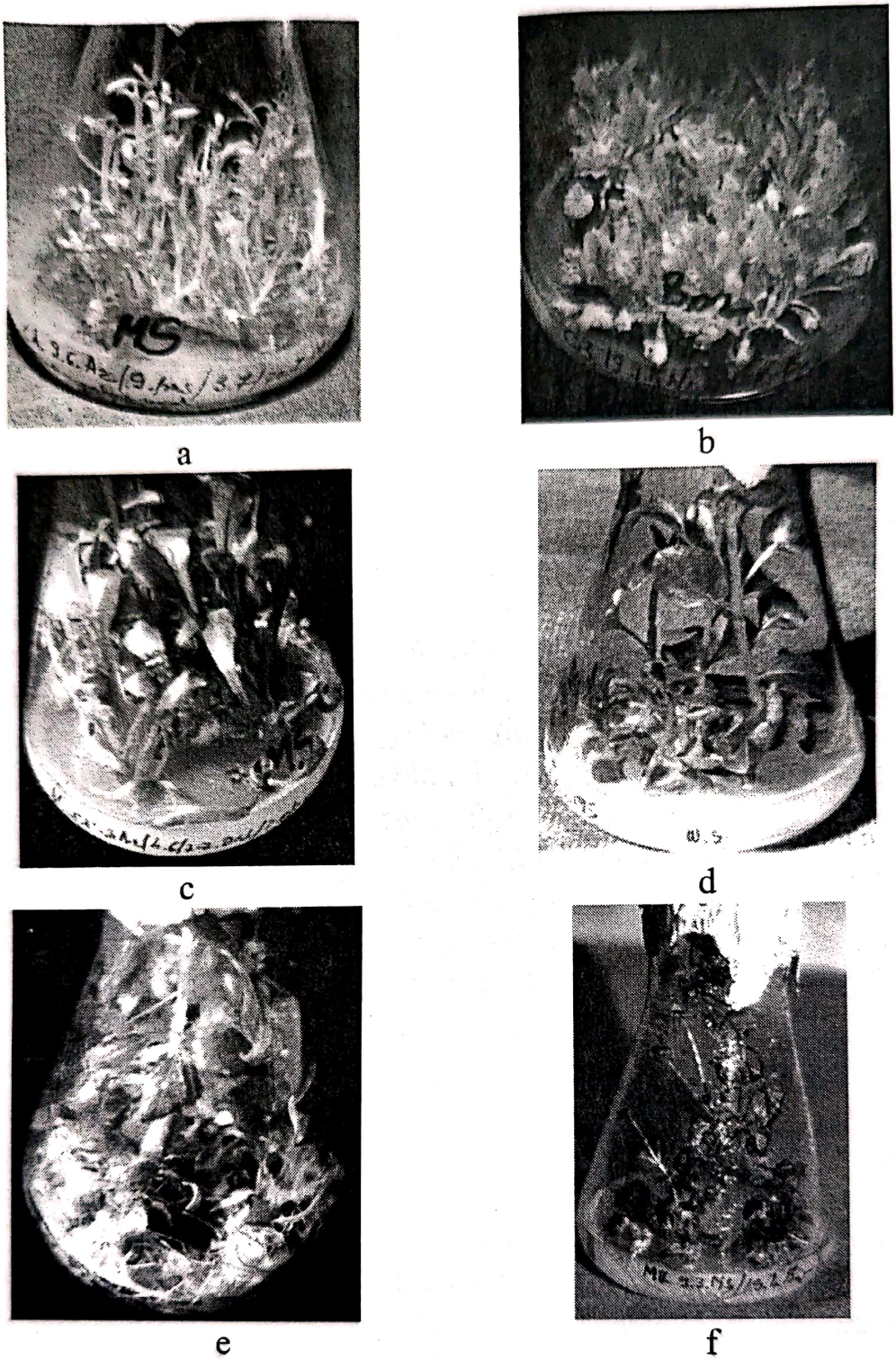


Fig. 4.7. Generarea de neoplantule din rozete de frunze bazale, noduri şi vârfuri de lăstari

a) lăstărire multiplă la *Lavandula angustifolia*; b) lăstărire multiplă la *Chrysanthemum balsamita*; c) neoplantule generate din rozete la *Digitalis lanata;* d-f) neoplantule formate din noduri la *Wihtania somnifera, Ocimum basilicum, Mentha viridis*

Scanned with OKEN Scanner

C. *Embriogeneza somatică*

În general, termenul de *embriogeneză* se referă la dezvoltarea embrionului din celula ou, fenomen întâlnit atât în lumea animală cât şi a plantelor. În cazul culturilor *in vitro,* teoretic oricare celulă vegetală vie îşi poate exprima totipotenţa, generând astfel un *embrion.* Cum apariţia acestei formaţiuni poate avea loc aşa cum am precizat, din oricare celulă somatică, ea poartă numele de *embrion adventiv* sau *embrion somatic.* Formarea embrionilor somatici (termen similar - *embrioizi*) se datorează diviziunii repetate a celulelor somatice, care se organizează morfo-structural după tipicul embrionului zigotic.

Apariţia embrionilor somatici, identici cu cei zigotici, poate avea loc direct pe explant, derivând direct din ţesuturile inoculate *in vitro* (*embriogeneză directă)*, sau mai frecvent din calusurile formate pe explantul iniţial ori în culturi celulare (*embriogeneză indirectă*). Diferenţa dintre cele două tipuri de dezvoltare este că embriogeneza directă rezultă din celule pro-embriogenice determinate, iar cea indirectă necesită dediferenţierea celulelor cu funcţii specializate, proliferarea calusului şi inducerea celulelor embriogene.

Fenomenul a fost observat de către STEWARD et al. şi de către REINERT (citaţi după CACHIŢĂ, 1987) la sfârşitul anilor 1960 în culturi *in vitro* la morcov şi s-a instalat pe fondul unui conţinut ridicat de citokinine în mediul de cultură, provenite din laptele de nucă de cocos introdus în mediul nutritiv. Numărul de specii la care a fost indusă embriogeneza somatică a crescut necontenit, fiind apreciată la nivelul anului 1993 ca fiind semnalată la 132 de specii, aparţinând la 81 de genuri şi 56 de familii de plante, (KIYOSUE, citat după PORTIC et al., 2004). Desigur că numărul plantelor la care s-au obţinut embrioni somatici în ultimii 10-12 ani trebuie să fie mult mai mare, numai că nu dispunem de date actualizate sub acest aspect. Există de asemenea şi specii, sau tipuri celulare, "recalcitrante" la inducerea embriogenezei somatice, (RAGHAVAN, 1983). CACHIŢĂ - COSMA (1987) a clasificat embrionii în următoarele tipuri:

1. *embrioni zigotici* - care apar din zigot, prin fertilizarea ovulului;
2. *embrioni ne-zigotici* - embrioni (diploizi sau haploizi) generaţi *in vivo* sau formaţi *in vitro* din alte celule decât zigotul. Aceştia pot fi la rândul lor:

Scanned with OKEN Scanner

a) *embrioni somatici* - care derivă din celule ale sporofitului, categorie care cuprinde şi embrionii adventivi ca embrioni somatici ce au luat naştere direct din alţi embrioni, organe sau celule;
b) *embrioni partenogenetici* - derivaţi din ovule nefertilizate;
c) *embrioni androgenetici* - generaţi din gametofitul mascul (microspori sau polen);
d) *embrioni ginogenetici* - derivaţi din celule ale gametofitului femel.

Studiile întreprinse de NUTI-RONCHI şi GIULIANO (1984) la morcov i-au condus la stabilirea a patru faze de diferenţiere embrionară şi anume:

- *faza de creştere izodiametrică,* în care are loc diviziunea neorientată a celulelor, care duce la stadiul globular, formaţiune de celule nepolarizate;
- *imprimarea treptată a caracterului de polaritate*, fază în care se produce o distribuţie polară a esterazelor (evidenţiată pe cale histochimică) şi care are loc de regulă în zona de apariţie a cotiledoanelor (stadiul globular polarizat);
- *fază de polaritate progresivă,* când diviziunile celulare devin orientate şi duc la formarea cotiledoanelor şi apexului rădăcinii, iar mai târziu duc la individualizarea meristemului apical al tulpinii (stadiul cordiform şi de torpilă);
- *faza de creştere bipolară,* în care se constituie treptat meristemele apical, radicular şi caulinar, capabile de a intra în diviziune, (CACHIŢĂ-COSMA , 1987).

În cultura *in vitro*, aşa cum am mai arătat, formarea embrionilor somatici poate fi evidenţiată la nivelul calusului, în culturile de celule derivate din calus sau din protoplaşti, ori la nivelul tulpinilor, frunzuliţelor etc, plantulelor neoformate *in vitro,* (fig. 4.8). Embrioizii caulinari sunt originari fiecare din câte o celulă unică epidermală, iar pe o astfel de tulpiniţă cultivată *in vitro* se pot forma 5 – 10 embrioni, (KONAR şi NATARAJAN , 1969).

Scanned with OKEN Scanner

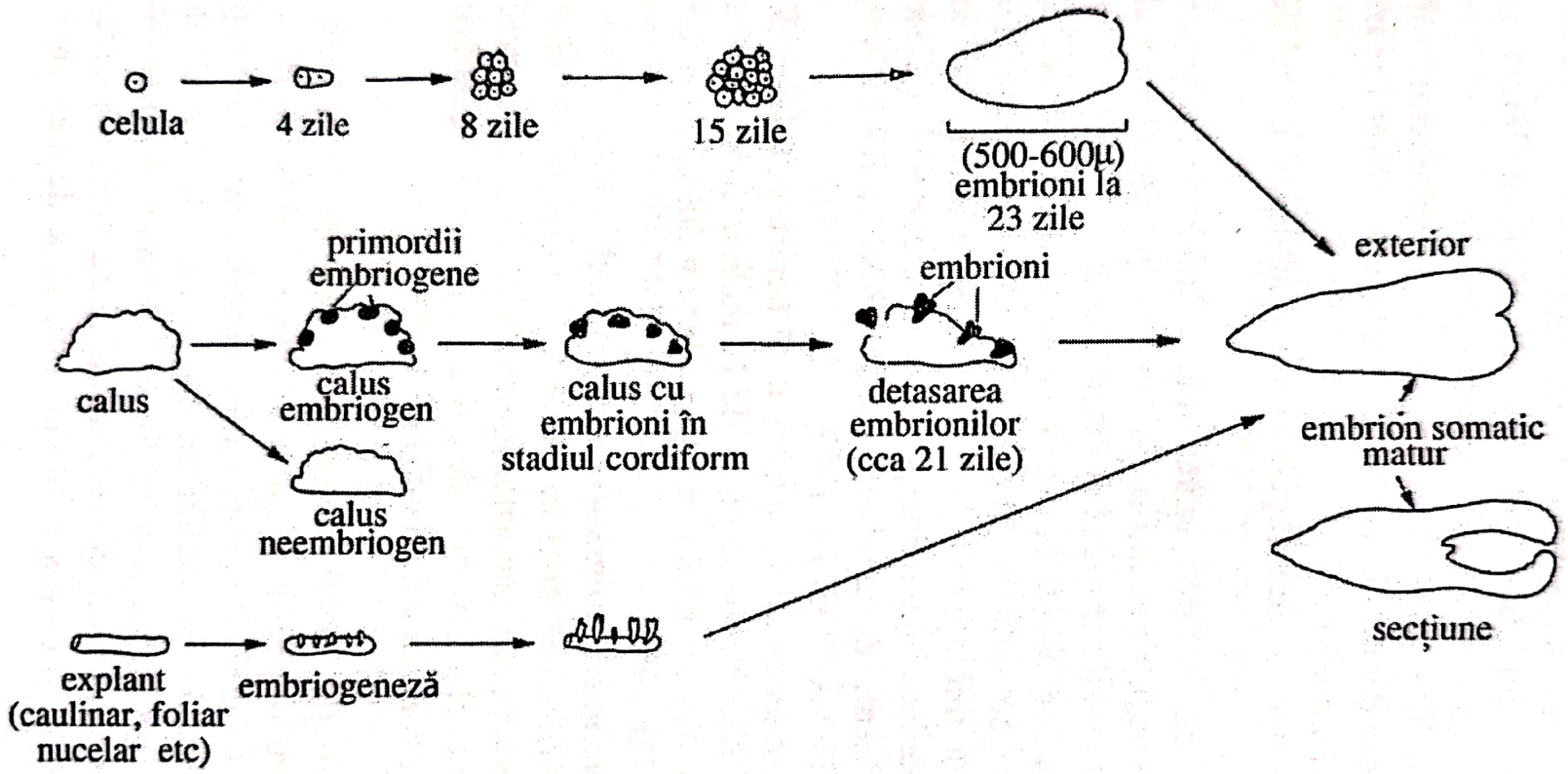


Fig. 4.8. Etapele embriogenezei somatice în cultura *in vitro,* (după CACHIȚĂ - COSMA, 1987)

Scanned with OKEN Scanner

În cultura de calus cât şi în cea de celule, studiile anatomice şi histologice, au evidenţiat prezenţa a două categorii de celule:

1. celule mari, care posedă o vacuolă mare, lipsite de potenţial embriogenic, prezente în calusul neembriogen;
2. celule de dimensiuni mai mici, cu un conţinut bogat în citoplasmă densă, capabile să formeze embrioni.

Acest din urmă tip de celule sunt frecvent grupate în aglomerări sub formă de noduli şi au fost denumite de către HALPERIN (1966) *mase proembrionice* sau *noduli embriogeni.*

S-a constatat că şi nodulii embriogeni conţin două tipuri de celule şi anume:

a) celule centrale, cu vacuolă mare, nuclei mici şi compacţi, nucleoli abia coloraţi, ribozomi puţini, cu rare profile de reticul endoplasmatic şi un număr redus de amiloplaste;

b) celule meristematice aflate la periferia nodulilor embriogeni, care în contrast cu celulele situate în centrul nodulului au vacuole puţine şi mici, iar nucleii sunt mari, difuz coloraţi şi conţin câte un nucleol bine evidenţiat. În aceste celule se găsesc depozite proeminente de amidon, (BHOJWANI şi RAZDAN, citaţi după CACHIŢĂ-COSMA, 1987).

În general, la dicotiledonate s-a constatat că pentru obţinerea de culturi embriogene este necesar să se plece de la inoculi constând din ţesuturi vegetative, iar la monocotiledonate din calusul indus din ţesuturi embrionare, (AMMIRATO, 1983).

Factori care influenţează embriogeneza somatică

Obţinerea de embrioni somatici în culturile *in vitro* de celule şi ţesuturi depinde de interacţiunea factorilor interni şi externi, dintre care amintim: specia, tipul de explant, mediile de cultură folosite şi regulatorii de creştere incluse în ele, condiţiile de incubare a culturilor etc.

a) *Explantul*

Capacitatea embriogenetică a diverselor specii de plante este diferită. De aceea, pentru obţinerea rezultatelor dorite trebuie utilizate explantele care prezintă o bună capacitate embriogenetică. În acest scop este necesară o documentare prealabilă asupra tipului de inocul ce urmează a fi cultivat pe mediile de iniţiere. Sunt importante informaţiile privind specia sau chiar genotipul cu care se lucrează, vârsta plantei mamă, organul de unde se prelevează fitoinoculii, faza de vegetaţie,

Scanned with OKEN Scanner

condiţiile în care au fost cultivate plantele donor. Dacă la iniţierea unei astfel de culturi se vor folosi explante provenite din cultura *in vitro*, în acest caz se va ţine seama de numărul de pasaje (subculturi) suportate de cultura utilizată ca punct de plecare.

Factorul genetic este foarte important în reacţia explantelor. La *Glycine max*, de exemplu, FINER (1988) a folosit ca explante embrioni imaturi proveniţi de la doi cultivari şi în aceleaşi condiţii de cultivare a obţinut procente diferite de embrioni somatici (10% la *Williams 82* şi 100% la *Fayette and Jack*). Pentru inducerea embriogenezei direct din explant, FINER (1995) recomandă utilizarea ca explante a embrionilor zigotici imaturi. Producţia de embrioni somatici, depinde şi în acest caz de stadiul de dezvoltare a explantelor (vârsta embrionilor imaturi).

Producerea embrionilor somatici este o operaţiune mai uşoară pentru unele specii, cum este cazul morcovului sau a unor graminee. VASIL (1984) aprecia că dacă se porneşte de la o sursă adecvată, cultura embriogenă poate fi menţinută o perioadă lungă de timp. De exemplu, la *iarba de Napir* (specie multiplicată normal prin butaşi), se pot produce *in vitro* mai mult de 25.000 de plante în câteva luni, utilizând ca material iniţial un segment de frunză, (CACHIŢĂ – COSMA, 1987).

Se consideră că explantele provenite din ţesuturi cu activitate mitotică intensă sunt cele mai potrivite pentru producerea de calus embriogen. Prezenţa ţesuturilor mature şi diferenţiate alături de celulele meristematice, poate cauza inhibarea procesului de embriogeneză. S-a constatat o diferenţă de reacţie şi la nivel de explant. În acest sens, MARGARA (1984), YAMADA et al. (1976) au raportat faptul că unele explante de *Solanum melongena* au produs calus embriogen, în timp ce în aceleaşi condiţii experimentale alte explante au produs calus neembriogen.

În cazul speciilor la care obţinerea de embrioni somatici are loc *via calus* se impune, aşa cum arăta VASIL (1987), identificarea şi selecţia vizuală a sectoarelor de calus embriogen şi îndepărtarea celor neembriogene, în cursul unor serii de subculturi. Uneori identificarea calusului embriogen este dificilă, datorită particularităţilor morfo-fiziologice de organizare ale acestuia, care sunt greu de intuit şi precizat. Pe de altă parte, nu se cunoaşte deocamdată calea de conversie a calusului neembriogen în embriogen.

Scanned with OKEN Scanner

Şi la nivelul culturilor de celule s-a observat existenţa unei variabilităţi privind capacitatea lor embriogenetică, (VASIL şi VASIL, 1980). La *Pennisetum americanum*, protoplaştii derivaţi din suspensii celualare embriogene au prezentat un potenţial regenerativ ridicat, după cum protoplaştii izolaţi din suspensii de celule nemorfogene la orz, porumb, iarba de Millet, orez, sorg, grâu, trestie de zahăr, au generat celule şi calus nemorfogen.

b) *Mediile de cultură*

Influenţa mediului de cultură asupra capacităţii embriogene a explantelor inoculate este determinată mai ales de compoziţia în săruri minerale (în special în azot) şi în regulatori de creştere. Pentru inducţia embriogenezei somatice, dar şi pentru susţinerea proceselor de maturare a embrionilor, se recomandă prezenţa azotului sub formă redusă. Mediul Murashige-Skoog (1962) este cel mai adesea folosit ca atare, sau modificat. Acesta, ca şi mediul B_5 (Gamborg et al., 1968) are în compoziţia sa un nivel ridicat de săruri minerale, precum şi un conţinut ridicat de azot sub formă redusă (azotat de amoniu, de exemplu). Comparativ, mediul White conţine o concentraţie mai scăzută în săruri minerale (de 10 ori) şi este mai sărac în azot sub formă de nitrat (nu conţine deloc azot redus). Ca sursă de azot redus pot fi folosiţi şi unii aminoacizi, cum ar fi L-glutamina, ori L-alanina. În toate cazurile însă, este necesară şi prezenţa unei surse de azot sub formă de nitrat, (CACHIŢĂ – COSMA, 1987). Un rol important în procesele de embriogeneză îl are şi conţinutul mediilor în potasiu şi fier.

Referitor la compoziţia mediilor nutritive în regulatori de creştere, rezultatele numeroaselor cercetări au arătat că lipsa auxinelor în mediile de iniţiere împiedică formarea embrionilor somatici. În schimb, prezenţa lor în cantitate mare în faza de maturare a embrionilor, poate avea repercursiuni negative. Se recomandă ca pentru fiecare specie, sau genotip chiar, să se determine prin tatonare tipul şi concentraţia regulatorilor de creştere adecvaţi în inducerea embriogenezei somatice. În cele mai multe cazuri prezenţa 2,4-D determină o reacţie pozitivă, însă cantitatea acestuia diferă de la o specie la alta. Şi alte tipuri de auxine pot fi utilizate în mediile de iniţiere şi anume: IAA, NAA, IBA. Comparând numărul embrionilor somatici formaţi în cultura *in vitro* la *Glycine max*, FINER (1995) a constatat că utilizând o variantă de mediu cu 40 mg/l

Scanned with OKEN Scanner

2,4-D şi o alta cu 10 mg/l NAA, numărul embrionilor a fost mult mai mare la nivelul explantelor inoculate pe mediul cu 2,4-D.

Există situaţii (la *Citrus* şi *Ilex*, de exemplu) în care apariţia embrionilor somatici are loc în absenţa regulatorilor de creştere în mediul nutritiv (CACHIŢĂ-COSMA, 1987), sau necesită atât prezenţa auxinelor cât şi a citokininelor, într-un anumit raport. Astfel, la *Ulmus minor* formarea calusului embriogenetic a avut loc în combinaţia: 23 µM 2,4-D şi 1,1 µM kinetină (CONDE et al., 2003), iar la *Gossypium hirsutum* apariţia embrioizilor s-a produs în prezenţa a 0,1 mg/l 2,4-D, asociat cu 0,1 mg/l IAA.

Conform afirmaţiilor lui EVANS et al. (citat după CACHIŢĂ - COSMA, 1987), citokininele au fost folosite în mediul de iniţiere (embriodiferenţiere) la cca 65,4% specii de cultură, iar în mediul secundar la cca 34,6% specii. Cea mai utilizată citokinină cu rol în apariţia embrionilor adventivi este zeatina. În general acţiunea pozitivă a citokininelor este evidenţiată în momentul transformării embrionilor în plante. Giberelinele se folosesc mai rar în procesul de inducţie embriogenetică, întrucât se consideră că această clasă de fitohormoni ar avea o influenţă inhibitoare, (HALPERIN, 1970). Totuşi, la chimion, adăugarea de GA_3 (acid giberelic) în mediul primar, alături de zeatină şi acidul abscisic, a determinat dezvoltarea normală a embrionilor somatici.

Se pare că şi etilena prezintă acţiune inhibitoare asupra embriogenezei dacă este introdusă în mediul de inducere, prin aceea că ar putea contracara efectul 2,4-D, (BHOJWANI şi RAZDAN, 1983). Dintre inhibitorii de creştere, acidul abscisic inhibă germinaţia embrionilor, antiauxinele (acidul 2,4,6-triclorfenoxiacetic şi acidul p-clorfeno-izobutiric) inhibă embriogeneza somatică.

Introducerea în mediul nutritiv a cărbunelui activ s-a dovedit utilă la numeroase specii de plante pentru inducerea embriogenezei somatice. Astfel, adăugarea cărbunelui activ în mediul de cultură la calusul de *Hedera helix* a condus la generarea de embrioni; dacă mediul nu conţinea cărbune activ se forma numai calus nediferenţiat, (CACHIŢĂ-COSMA, 1987).

c) Condiţiile de cultură

În funcţie de specie regimul optim de iluminare a culturii embriogene variază. La multe specii, cum ar fi *Daucus* şi *Carum* (CACHIŢĂ-COSMA, 1987), *Ulmus* şi *Olea* (SANTOS et. al., 2003)

Scanned with OKEN Scanner

maturarea embrionilor se petrece mai bine la întuneric. La *Nicotiana* însă, este necesară lumină de intensitate ridicată.

Temperatura de incubare depinde de specie, dar în general temperatura optimă pentru cultivarea *in vitro* a explantelor la majoritatea speciilor este de 23 – 24^{0}C. Pentru *germinarea* embrionilor însă, este necesară aplicarea unor *şedinţe de frig* pentru ca embrionii să dea naştere la plantule. De exemplu, la viţa de vie se recomandă plasarea culturii la +4^{0}C timp de două săptămâni, în oricare stadiu de dezvoltare după atingerea stadiului globular, (CACHIŢĂ – COSMA şi SAND, 2000). În cazul culturii de antere sau microspori, în funcţie de specie, explantele sunt supuse tratamentului la temperaturi ridicate, (HU şi YANG, 1986; HIRAMATSU et. al., 2004). Se pare că uneori se pot acumula în flacoanele de cultură compuşi volatili care pot influenţa negativ dezvoltarea embrionilor somatici; un nivel mai ridicat al oxigenului în vasele de cultură favorizează însă procesul.

Aplicaţii practice ale embriogenezei somatice

Embriogeneza somatică prezintă numeroase avantaje dintre care amintim:

- într-un timp scurt şi cu eficienţă ridicată, prin practicarea acestei tehnici de propagare a plantelor, se poate realiza un număr mare de copii ale unui organism vegetal elită. Astfel, dintr-un singur recipient de cultură se pot recolta numeroşi embrioni care apoi pot fi transformaţi în *seminţe artificiale* prin încapsularea lor în materiale speciale degradabile în sol;
- plantele derivate din embrioni somatici sunt adesea identice din punct de vedere genetic cu exemplarul donor de explante, dacă sunt obţinute prin embriogeneză somatică directă;
- cultura realizată prin folosirea embrionilor somatici este (iniţial) liberă de agenţi patogeni. Creşterea culturii este uniformă, plantele sunt viguroase şi calitatea lor deosebită;
- embrionii somatici pot fi stocaţi o lungă perioadă de timp în bănci de gene, în condiţii de temperatură scăzută;
- embrionii somatici pot fi folosiţi pentru producerea de biomasă şi obţinerea *in vitro* a unor compuşi secundari de metabolism;
- folosirea embriogenezei somatice în regenerarea de plante poate fi utilă în studiile de mutageneză, permiţând obţinerea şi

Scanned with OKEN Scanner

selectarea rapidă a unor mutanți (genotipuri noi) și răspândirea lor în cultură;

- printre embrionii somatici se pot izola plante cu grade diferite de ploidie (haploizi și triploizi) necesari în programele de ameliorare ale unor specii etc.

4.1.3. Utilizarea culturilor *in vitro* pentru micropropagarea plantelor

Înmulțirea *in vitro* a plantelor mai poartă denumirea și de *micropropagare*, *micromultiplicare* sau *microînmulțire*, fiind o formă de multiplicare vegetativă, care asigură obținerea unui randament superior comparativ cu alte procedee clasice de înmulțire vegetativă. Capacitatea unor plante de a se înmulți vegetativ *in vivo* este demult cunoscută și folosită, dar este restrânsă la puține specii, necesitând în plus, un volum mare de lucru și având un randament limitat.

Descoperirea posibilității de micropropagare *in vitro*, care este tot o înmulțire de tip vegetativ, a lărgit foarte mult numărul speciilor ce pot fi multiplicate astfel, a scurtat durata de obținere a plantelor și a sporit considerabil randamentul de multiplicare. Pentru unele specii de valoare economică ridicată, a scăzut mult și prețul de cost necesar obținerii materialului săditor, acestea fiind și speciile la care tehnica de micropropagare este mai frecvent folosită, (GHIORGHIȚĂ, 1990).

Înmulțirea vegetativă *in vitro* a fost posibilă odată cu punerea la punct a tehnicilor de cultivare pe medii aseptice a diferitelor tipuri de explante vegetale. Prin intermediul acestor tehnici se urmărește fie o înmulțire extrem de rapidă a plantei, fie o înmulțire clonală, în direcția neoformării de tulpinițe și rădăcinițe, ori de embrioni.

Tehnicile de micropropagare au comun două aspecte esențiale:

a) utilizarea unor medii de cultură mai mult sau mai puțin complexe, solide, semisolide sau lichide

b) condiții artificiale, aseptice, de incubare și creștere a plantulelor.

Pentru regenerarea de plante *in vitro* în culturi de țesuturi și celule, există 3 metode diferite:

a) *Inducerea embriogenezei somatice*

Este cea mai rapidă și mai eficientă metodă de micropropagare, ea permițând obținerea a milioane de plante dintr-un volum redus de celule. Acest lucru se datorează așa cum s-a prezentat deja capacității celulelor

Scanned with OKEN Scanner

somatice ale unor plante de a-şi exprima totipotenţa *in vitro*, embrionii somatici comportându-se asemănător cu cei zigotici. Aceştia se pot forma direct pe explant sau, în cele mai multe cazuri, din celulele calusale ori din celulele cultivate în suspensie.

În cazul embriogenezei somatice directe, plantele regenerate sunt uniforme genetic, fiind identice cu materialul iniţial. Regenerarea plantelor din embrionii apăruţi la nivelul calusului prezintă o mare variabilitate genetică, datorată unor modificări genetice de tipul poliploidiilor, aneuploidiilor, restructurărilor cromosomiale.

b) *Formarea lăstarilor adventivi*

Metoda constă în generarea de lăstari *in vitro* pe alte ţesuturi decât *in vivo*. Mai precis, inducerea mugurilor adventivi se poate realiza fie direct pe explant, prin organogeneză directă, fie din calusuri – prin organogeneză indirectă.

Şi în acest caz, când sursa de celule somatice este calusul, apare problema instabilităţii genetice a plantelor regenerate.

c) *Lăstărirea axilară multiplă*

Această metodă de micropropagare asigură o uniformitate genetică ridicată, deoarece ea asigură reluarea proceselor de creştere a vârfurilor de lăstari inoculate sau dezvoltarea de lăstari din mugurii axilari, evitând astfel generarea de lăstari via calus. Odată iniţiată proliferarea lăstarilor, se ajunge la un randament ridicat al acestei metode, ratele de multiplicare fiind mult mai mari decât atunci când se aplică metodele clasice.

Multiplicarea vegetativă *in vitro* foloseşte diverse tipuri de explante: *organe* (flori, muguri, frunze etc.), *explante tisulare* (meristem primar situat în apexul tulpinii sau în mugurii axilari), ori *meristeme secundare* (cambiu); diverse fragmente de organe conţinând ţesut heterogen, calus etc.) şi *celule* (suspensii celulare primare sau derivate din protoplaşti), (EVANS, 1981).

Cel mai ridicat randament de înmulţire vegetativă se poate realiza prin regenerarea de plante din calus. Această cale este indicată şi în cazul când se urmăreşte izolarea de genotipuri noi, prin specularea variabilităţii genetice care însoţeşte acest proces, frecvent remarcată în culturile *in vitro* de celule şi protoplaşti, aşa numita variabilitate somaclonală (gameto-, protoclonală). Astfel, pe un fond genetic iniţial comun, poate rezulta o gamă largă de genotipuri, care oferă posibilitatea selectării de

Scanned with OKEN Scanner

celule şi respectiv clone cu însuşiri dorite (toleranţă la stres, săruri, metale, erbicide, extreme termice, aciditate sau alcalinitate excesivă a solului etc.). Plasticitatea informaţională nativă a celulei vegetale a făcut posibil ca în condiţii experimentale corespunzătoare, indiferent de nivelul specializării sale, aceasta să-şi exprime în întregime (prin embriogeneză somatică) sau parţial (prin organogeneză) potenţialul morfogenetic al speciei, (BREZEANU, 1993).

Clonarea, prin tehnicile de micropropagare, se poate realiza, aşa cum aminteam anterior, cu cea mai mare siguranţă pornind de la explante constând în muguri, apexuri, meristeme, precum şi de la culturi de celule, prin inducerea embriogenezei somatice, respectând condiţiile adecvate, optime de cultură şi a evita prezenţa unor factori mutageni. Multiplicarea clonală este mai puţin sigură atunci când se bazează pe formarea de muguri adventivi la nivelul zonelor de cicatrizare sau la suprafaţa epidermei.

În cazul multiplicării vegetative clonale a plantelor trebuie să se ţină cont, mai ales în condiţiile de cultivare industrială, de asigurarea obţinerii într-un ritm rapid de copii conforme cu plantele donatoare, păstrându-se nealterate toate calităţile plantei, a genotipului de la care s-a plecat. Astfel, trebuie evitată apariţia variabilităţii somaclonale, lucru care se poate realiza plecând de la inoculi cu o structură deja organizată (meristeme, mini- sau macro-butaşi) şi prin controlul strict al regulatorilor de creştere. De exemplu, o balanţă hormonală necorespunzătoare conduce la neoformarea din inoculi a calusului, în celulele căruia pot avea loc schimbări în cadrul genofondului, (GAUTHERET, 1980).

Având în vedere interesul acut al specialiştilor pentru creşterea randamentului de multiplicare clonală a genotipurilor valoroase, la un preţ cât mai scăzut, s-a creat o adevărată industrie în acest scop. Sute de laboratoare de biotehnologii din lume au pus la punct tehnologii de micropropagare *in vitro* la peste 1000 de specii diferite de plante, (BAJAJ,1991). Nu înseamnă că această tehnică se şi foloseşte la un număr atât de mare de plante, ci doar în cazul celor în care procurarea de material săditor pe această cale este mai rentabilă decât prin metodele tradiţionale, în cazul când se urmăreşte păstrarea nealterată a calităţilor de producţie ale unor genotipuri, sau când se vizează obţinerea de plante libere de virusuri.

Scanned with OKEN Scanner

Un succes deosebit l-a reprezentat punerea la punct a unei metode de multiplicare *in vitro* la orhidee, plante alogame a căror frumusețe a florilor este de neasemuit, dar care au unele dificultăți în realizarea polenizării, produc extrem de puține semințe, cu germinare slabă, heterogene genetic etc, ceea ce face ca înmulțirea lor pe căi convenționale să fie dificilă. De aici şi prețurile foarte mari ale florilor de orhidee, apreciindu-se că afacerile cu orhidee sunt chiar mai avantajoase decât cele cu sfecla de zahăr, (CRĂCIUN, 1987). Înmulțirea *in vitro* a venit în întâmpinarea cultivatorilor şi cumpărătorilor de orhidee, dintr-un mic fragment de plantă putând fi obținute câteva milioane de indivizi pe an. De altfel, culturile de țesuturi *in vitro* sunt larg răspândite în propagarea unor plante horticole, cum ar fi: dalia, trandafirul, gerbera, garoafa, crizantema, frezia etc, (GHIORGHIȚĂ şi ONISEI, 1990).

Un alt exemplu edificator îl reprezintă micropropagarea la palmierul de ulei, plantă oleaginoasă care ocupă se pare locul II în lume în producția de ulei. Palmierul de ulei are o durată de viață de peste 100 de ani, dar exploatarea culturilor cu această specie este rentabilă până la vârsta de 25-30 de ani, fapt ce impune reînnoirea plantațiilor după acest interval de timp. Plantă alogamă fiind, palmierul de ulei prezintă o mare variabilitate genetică a descendenței şi implicit a producției de ulei. Cum specia nu poate fi înmulțită pe cale vegetativă, s-a recurs la clonarea *in vitro*. După o muncă migăloasă şi de durată, s-a pus la punct o metodă de micropropagare la scară semiindustrială a palmierului de ulei şi chiar dacă prețul de cost pentru producerea puieților este mai mare decât prin metodele clasice, investiția se justifică având în vedere durata de exploatare a culturii şi stabilitatea caracterelor de producție, (SASSON, 1988).

Un impact deosebit a avut practicarea metodei şi la căpşun, la care înmulțirea prin stoloni este anevoioasă, iar practicarea acesteia nu evită pierderile de material biologic datorate virozării plantelor. Soluția a fost şi în cazul acestei specii multiplicarea clonală şi folosirea ca material de inițiere a culturii *in vitro* a vârfurilor de lăstari (libere de virusuri). Rezultatul final a fost punerea la punct a unei tehnologii *in vitro* de producere a materialului săditor incomparabil mai eficientă, de o calitate deosebită, obținut la un preț de cost cu cca 50% mai scăzut decât prin practicarea metodelor clasice de înmulțire, (CACHIȚĂ-COSMA, 1985; CRĂCIUN, 1987; SASSON, 1988).

Scanned with OKEN Scanner

Micropropagarea *in vitro* a fost adoptată şi în ţara noastră ca o metodă de înmulţire vegetativă eficientă şi de obţinere de material săditor sănătos de către o serie de unităţi de cercetare şi producţie din reţeaua agriculturii, silviculturii şi biologiei, cum ar fi: ICCP Mărăcineni, ICVV Valea Călugărească, ICCPT Fundulea, Serele Codlea, INSB Bucureşti, Universităţile din Bucureşti, Iaşi, Cluj Napoca, Oradea etc. În cadrul cercetărilor noastre la Centrul de cercetări "Stejarul" Piatra Neamţ şi la Universitatea din Bacău am pus la punct tehnologii de multiplicare la o serie de plante medicinale şi aromatice, cum ar fi: *Vinca minor*, *Digitalis purpurea*, *Withania somnifera*, *Stachys sieboldii*, *Sedum hybridum*, *S. fabaria*, *Melissa officinalis*, *Mentha viridis*, *Mentha piperita*, *Chrysanthemum balsamita*, *Ocimum basilicum* etc.

Cultura *in vitro* de ţesuturi şi celule vegetale în vederea multiplicării şi propagării unor soiuri şi genotipuri valoroase, pe lângă avantajele economice evidente, are şi o însemnătate ştiinţifică deosebită: ea permite ca unele specii, altădată sau în prezent înmulţite obişnuit prin sămânţă, să fie convertite la înmulţirea vegetativă, superioară în multe privinţe celei sexuate când se urmăresc anumite obiective. Prin polenizare-fecundare, cele mai prolifice plante produc într-un ciclu de cultură câteva zeci până la sute de seminţe, iar la plantele alogame în lipsa polenizării controlate aceste seminţe sunt heterogene şi în consecinţă cultura la care vor da naştere va fi neuniformă.

Deosebiri nete, pozitive, prezintă cultura *in vitro* de explante tisulare şi celulare: dintr-un singur fragment, prin clonări succesive în condiţii aseptice într-un singur an, se pot obţine zeci şi sute de mii, chiar milioane de plante utilizabile ca material săditor. Provenind din acelaşi genotip, asemenea plante vor fi identice genetic şi uniforme fenotipic. De exemplu, la garoafă, prin metodele clasice, dintr-o singură plantă mamă se pot recolta într-un sezon bun cca 20 de butaşi/an. O plantă multiplicată *in vitro* poate furniza anual cca 500.000 de descendenţi. Un alt avantaj al micromultiplicării vegetative îl reprezintă şi faptul că practicarea tehnicii nu ţine seama de sezon sau generaţie, scurtându-se astfel sensibil procesul de înmulţire a materialului pentru producţie. De asemenea, obţinerea materialului săditor se poate face în regim programat, nefiind legată de sezon, de fenomenul de latenţă etc. Dacă prin metodele clasice este necesar un volum mare de muncă, fiind nevoie şi de spaţiu suficient, înmulţind plantele prin metode de micropropagare, se realizează

Scanned with OKEN Scanner

economie de spaţiu. Astfel, pe o etajeră de 60 x 125 cm pot fi amplasate cca 1000 de plantule în eprubete. Totodată, prin culturile *in vitro* se poate asigura o conservare a materialului iniţial destinat înmulţirii, prin efectuarea de pasaje periodice şi prin conservarea la temperaturi scăzute (crioconservare) a materialului biologic (meristeme sau plantule în diferite faze de dezvoltare).

Prin tehnicile *in vitro* se pot propaga varietăţi noi sau specii dificil de înmulţit care fie nu au seminţe viabile, fie că nu se înmulţesc natural pe cale vegetativă. Pe această cale este posibilă şi propagarea plantelor elită, mai ales în cazurile în care nu există posibilitatea de înmulţire vegetativă a genotipurilor.

De dorit este ca metodele de multiplicare şi propagare *in vitro* să fie practicabile şi să se extindă la speciile vegetale de importanţă economică (chiar dacă fiecare în parte posedă cerinţe particulare de cultură *in vitro*). În horticultură aceste metode sunt mult mai extinse, întrucât materialul rezultat prezintă calităţi superioare, răspunde mai bine unor nevoi de producţie, în raport cu cel obţinut prin tehnicile clasice.

Pe lângă aceste avantaje, trebuie cunoscut faptul că tehnica prezintă şi o serie de riscuri, în special în condiţiile unei producţii de material săditor de tip industrial sau semiindustrial. Astfel, cultura monoclonală sau a unui număr mic de clone, poate facilita selecţia naturală a unor dăunători, care pot să distrugă într-un timp relativ scurt cultura. Introducerea în cultură a unor clone rezistente la atacul dăunătorilor permite redresarea rapidă a unei astfel de situaţii, (DUNWELL, 1987). În cultura *in vitro* pot apărea fenomene insuficient explicate şi dificil de prevenit sau de combătut, cum ar fi *hiperhidria* (*vitroza*). Fenomenul poate apare brusc, iar plantele afectate de vitroză au frunzele recurbate, sticloase, casante, tulpinile mai groase şi suculente; lăstarii care suferă de hiperhidrie nu mai generează rădăcini. Combaterea fenomenului prin solidificarea mai accentuată a mediului nutritiv, sau prin reducerea aportului de nutrienţi nu este adeseori posibilă, impunând reluarea acţiunii de iniţiere a culturii *in vitro*. Un alt fenomen întâlnit (mai rar) în acest tip de culturi este cel al "lipsei (absenţei) acţiunii", fenomen cunoscut şi sub numele de *anergism* sau *habituaţie*.

Scanned with OKEN Scanner

4.1.4. Obţinerea de plante libere de virusuri

Cultura *in vitro* de meristeme este aplicată cu succes nu numai în propagarea rapidă şi în masă a unor soiuri, sau în prezervarea unor genotipuri valoroase, ci şi în izolarea şi menţinerea de plante sănătoase, materialul vegetal neoformat *in vitro* din anumite explante fiind lipsit de agenţi fito- sau zoopatogeni. Noţiunea de „liber de viroze" este utilizată în sens limitat, şi anume doar pentru virusurile pentru care planta este testată, deoarece pe aceeaşi plantă pot exista şi alte virusuri, neidentificate.

Încă din 1949 se observase că porţiuni foarte minuscule din meristemele apicale ale unor plante infectate erau sănătoase. Pe baza acestei observaţii, în 1952 MOREL şi MARTIN au pus la punct tehnica înmulţirii meristematice în scopul devirozării. Bazându-se şi pe cercetările efectuate de WHITE, LIMMASET şi CORNUET au reuşit regenerarea de plante libere de virusuri, prin cultivarea *in vitro* a unor zone meristematice, recoltate de la plante infectate.

Primele plante citate în literatura de specialitate ca fiind reuşite ale regenerării de plante sănătoase (pornind de la plante donatoare virozate) sunt: dalia, orhideele, cartoful. Metoda s-a extins treptat şi la alte specii de plante cum sunt: narcisele, lalelele, gladiolele, cireşul, bananierul, prunul, mărul, zmeurul, migdalul, viţa-de-vie etc.

Conform literaturii de specialitate, tehnica de combatere a virozelor implică 4 etape:

- identificarea virusurilor prezente în plante;
- terapia lor;
- testarea plantelor tratate;
- propagarea regeneranţilor prin culturi de meristeme şi continuarea testării plantelor obţinute, (RAICU, 1990).

În scopul identificării virusurilor se pot folosi plante indicator, metode serologice, sau electronomicroscopia.

În timp ce bolile generate de bacterii şi ciuperci pot fi eradicate prin tratamente chimice, singurele metode practice utilizate pentru eliminarea virozelor la speciile înmulţite vegetativ sunt: *cultura de meristeme şi/sau termoterapia.*

În cazul regenerării prin culturile de ţesuturi este suficientă obţinerea unei singure plantule sănătoase, provenită din material iniţial bolnav, pentru ca aceasta să fie apoi multiplicată prin metode

Scanned with OKEN Scanner

convenţionale sau prin micropropagare. Astfel, cultura *in vitro* de meristeme reprezintă una din căile care asigură obţinerea pe scară largă a plantelor libere de viroze. Metoda poate fi aplicată la numeroase specii de plante, deoarece în general, în zonele apicale ale rădăcinilor sau vârfurilor de creştere ale tulpinii, concentraţia virusurilor este mai redusă sau ele sunt chiar absente.

Succesul culturii de meristeme depinde parţial şi de tipul de virusuri prezente, unele fiind mai uşor de eliminat decât altele. Un impact deosebit asupra rezultatelor îl are dimensiunea explantului folosit în iniţierea culturii. În general, numărul plantelor libere de virusuri regenerate, este invers proporţional cu mărimea meristemului cultivat. De exemplu la garoafă, plantulele obţinute din explante cu dimensiuni mai mari de 0,75mm prezentau virusuri, în timp ce explantele cu dimensiuni până la 0,5 mm au dat cele mai bune rezultate în producerea de regeneranţi sănătoşi, (CACHIŢĂ – COSMA, 1987).

O serie de experienţe au arătat că unele virusuri pot invada şi celulele meristematice, în funcţie de tipul de virus şi specia gazdă implicată. Reuşita acestei metode în obţinerea de plante sănătoase poate fi certificată numai pe baza rezultatelor testelor efectuate pe regeneranţi.

O altă metodă utilizată în devirozarea plantelor este aplicarea unor tratamente termoterapeutice. Metoda constă în menţinerea plantelor timp de 5-7 săptămâni la temperaturi cuprinse între 33 – 50^{0}C. În acest interval de timp, virusurile îşi pierd capacitatea de a se multiplica şi de a infecta alte celule. În acest fel, virusurile nu mai pot migra din celulele în care ele se aflau în momentul începerii termoterapiei, spre celulele nou formate. Ca urmare, este posibilă prelevarea de pe aceste plante a unor meristeme mai mari, care să constituie baza de iniţiere a unei culturi *in vitro* sănătoase. Mărimea meristemelor ce vor fi inoculate creşte de la 0,1 - 0,25 mm (la plantele nesupuse termoterapiei) la 0,5 – 1 mm (la cele tratate), lucru care determină o mărire a capacităţii regenerative a explantelor. Combinarea celor două metode asigură un randament maxim în obţinerea de plante devirozate, întrucât recoltarea şi inocularea explantelor se realizează mult mai rapid. Dimensiunile mai mari ale explantelor permit regenerarea unui număr mai mare de plante sănătoase.

În unele cazuri, în special la atacul viroizilor (particule care pot să pătrundă până la meristem, fiind rezistenţi la căldură), termoterapia trebuie combinată cu administrarea de substanţe care pot diminua

Scanned with OKEN Scanner

infecția (sau cu analogi de baze azotate), substanțe ce vor fi introduse în substratul de cultură al meristemelor, (SASSON, 1998).

Un accent deosebit se pune pe obținerea de mutanți vegetali viruso-rezistenți, la nivel de calus cultivat *in vitro*, întrucât la nivelul acestuia s-a constatat prezența unor mase celulare rezistente la infecțiile virale, alături de celulele infectate, (WANG, 1985).

O altă metodă aplicată cu succes şi propusă de NAVARRO, este aceea a microaltoirilor executate *in vitro*. Metoda constă în „altoirea" meristemelor prelevate de la o plantă infectată, pe o plantă sănătoasă, neoformată *in vitro*. Astfel s-a reuşit obținerea de plante devirozate la citrice, măr etc, (WANG, 1985).

Deoarece au constatat că plantele devirozate nu sunt imune şi la alte boli, MOREL şi MARTIN au propus crearea unor „bănci" cu plante sănătoase stocate *in vitro*, urmând ca apoi acestea să fie multiplicate. Acest lucru a fost realizat la dalii (1952) şi la cartof (1955). În 1960, MOREL a pus bazele tehnicilor de micropropagare *in vitro* la *Cymbidium* în scopul obținerii de clone sănătoase. Autorul a apreciat că într-un singur an, dintr-un explant se pot obține cca 4 milioane de plante identice din punct de vedere genetic şi libere de virusuri. Metoda a fost apoi aplicată la numeroase specii ornamentale, pomi fructiferi, plante silvice, vița de vie.

Reuşita eliminării virusurilor prin metodele menționate anterior poate fi certificată, aşa cum am mai precizat, numai pe baza testelor efectuate după aceea. Testele constau fie în indexarea/identificarea pe „plante indicatori", cum ar fi *Chenopodium*, tutun sau alte specii, care sunt foarte sensibile la atacul virusurilor, fie printr-un control serologic, similar cu tehnica utilizată în medicină, (RAICU, 1990). În prezent, peste 60 de specii de plante sunt cultivate *in vitro* pentru clonare şi indexare ca fiind libere de viroze, (CACHIȚĂ-COSMA, 2000).

Cultura *in vitro* de meristeme este domeniul în care s-au realizat cei mai favorabili şi mai rapizi paşi, cu rezultate economice considerabile în ceea ce priveşte înființarea unor industrii de multiplicare şi micropropagare clonală a unor indivizi valoroşi, certificați ca fiind şi liberi de agenți fito- sau zoofitopatogeni.

Scanned with OKEN Scanner

4.1.5. Obținerea de protoplaşti şi de hibrizi somatici la plante

Celula vegetală, spre deosebire de cea animală, este prevăzută cu perete celular, a cărui structură este complexă, iar compoziția lui chimică se modifică în cursul procesului de diferențiere celulară. Deoarece sunt prevăzute cu perete celular, celulele vegetale, inclusiv cele meristematice, puse în contact pe un mediu de cultură, nu fuzionează.

Ideea de a îndepărta peretele pecto-celulozic îi aparține lui HANSTEIN (1880), care a şi dat denumirea de *protoplast* acestei formațiuni, pentru a indica o celulă vie fără perete celular, ea fiind înconjurată numai de membrana plasmatică. Aceste celule „nude" au capacitatea să-şi refacă peretele celular, să crească şi să se dividă, în condiții de cultură specifice. Lipsit de peretele celular, protoplastul devine apt pentru o serie de manipulări experimentale, cu importanță deosebită atât pentru cercetarea structurilor şi funcțiilor protoplasmatice, cât şi pentru manipularea genetică. Ei pot fi determinați să fuzioneze, sau să înglobeze material genetic exogen. Astfel, în urma fuziunii protoplaştilor care aparțin la specii diferite se obțin *hibrizi somatici*, iar prin înglobarea în nucleul protoplaştilor a unor gene (străine), care le conferă caractere noi, se pot obține plante *transgenice*.

4.1.5.1. Izolarea protoplaştilor

Primele tehnici de îndepărtare a peretelui celular se bazau pe *metode mecanice*, care erau însă greoaie şi permiteau obținerea unui număr mic de protoplaşti viabili. Folosind această metodă, KLERCKER (1892) a reuşit obținerea unui număr redus de protoplaşti la specia *Stratiotes aloides*.

Marile realizări în acest domeniu, au luat amploare din 1960, când COCKING a izolat primii protoplaşti la tomate (*Lycopersicon esculentum*) folosind o nouă metodă, bazată pe îndepărtarea pereților celulari, prin digerarea acestora cu ajutorul unor celulaze (enzime specifice produse de ciuperci). Mai târziu, metoda a fost îmbunătățită, peretele celular putând fi digerat cu ajutorul preparatelor enzimatice celulozolitice sau pectinolitice, produse industrial. Această tehnică oferă avantajul obținerii unei cantități mari de protoplaşti, fără ca celulele să fie deteriorate. Dezvoltarea metodelor enzimatice de izolare a protoplaştilor, care permite obținerea a aproximativ 1.000.000 de protoplaşti dintr-un gram de țesut vegetal, a deschis noi posibilități de

Scanned with OKEN Scanner

investigare atât în ceea ce se numeşte astăzi biotehnologia protoplaştilor vegetali, cât şi în ingineria genetică, (CACHIȚĂ – COSMA et al., 2004).

Întrucât celula vegetală este turgescentă, trebuie avut în vedere ca îndepărtarea peretelui celular să se facă într-o soluție hipertonică (soluție cu potențial osmotic negativ). În acest fel se împiedică umflarea şi spargerea protoplaştilor - datorită pătrunderii apei în exces, ori deshidratarea lor - datorită pierderii apei. Astfel, pentru păstrarea viabilității acestora, ajustarea presiunii osmotice se realizează adăugându-se *manitol* sau *sorbitol* soluțiilor şi mediilor de cultură folosite în protocolul experimental, până la refacerea peretelui celular.

Tehnica izolării protoplaştilor prin *metoda enzimatică*, parcurge următoarele etape:

a) sterilizarea materialului biologic - sursă de protoplaşti;
b) digestia enzimatică a pereților celulari;
c) izolarea şi spălarea protoplaştilor.

În general, se pot obține celule „nude" în cantități mari din diferite organe şi țesuturi vegetale, cu condiția ca celulele lor să prezinte pereți primari, fără îngroşări secundare, alcătuiți mai ales din celuloză. Cele mai folosite *surse de protoplaşti* sunt țesuturile tinere, aflate în creştere activă, a căror celule sunt nelignificate, cum ar fi: mezofil foliar, țesuturi epidermale, petale, grăunciori de polen în curs de germinare, rădăcini tinere şi nodozități radiculare, fructe, etc. Explantele pot proveni de la plante crescute în câmp, seră, sau chiar de la plante cultivate *in vitro*.

Întrucât cantitatea, viabilitatea şi calitatea protoplaştilor sunt influențate de vârsta materialului biologic, precum şi de starea fiziologică a acestuia, se consideră că cea mai bună sursă o reprezintă plantele crescute în condiții controlate de lumină, temperatură şi nutriție. În anumite cazuri, în funcție de specia utilizată, se recomandă aplicarea unor pretratamente, cum ar fi: menținerea plantelor la întuneric timp de câteva ore înaintea recoltării explantelor, menținerea lor la temperaturi scăzute, aplicarea unor tratamente stimulative de creştere etc. S-a constatat că cele mai bune rezultate se obțin prin folosirea frunzelor prelevate de la plante tinere sau de pe lăstari noi, cultivate în câmp sau în seră. Explantele trebuie sterilizate. Sterilizarea se realizează prin introducerea frunzelor în alcool 70° timp de 1 minut, tratarea lor cu soluții care distrug bacteriile şi mucegaiurile (pentru o durată de timp ce

Scanned with OKEN Scanner

variază în funcţie de soluţia folosită) şi spălări repetate cu apă distilată sterilă.

După sterilizare şi îndepărtarea epidermei inferioare, materialul vegetal, tăiat transversal în fragmente înguste, este supus tratamentului enzimatic pentru digestia pereţilor celulari, acţiune care are loc într-o soluţie de enzime care conţine:

- un stabilizator osmotic (manitol sau sorbitol);
- pectinaze, care dizolvă lamela mijlocie şi separă peretele;
- celulaze şi hemicelulaze, cu rol în degradarea peretelui celulozic şi eliberarea protoplaştilor.

În perioada de pionierat a izolării protoplaştilor, se utiliza sucul gastric de melc (*Helix pomatia*), ca sursă de hemicelulaze. Odată cu extinderea cercetărilor de biologie celulară şi moleculară, şi mai ales a celor de inginerie genetică, care au folosit ca sisteme experimentale protoplaştii, s-a progresat şi în domeniul preparatelor enzimatice, care sunt comercializate sub diferite denumiri: *Celulaza R-10*, *Macerozim R-10*, *Drisdelază*, *Pectoliază Y-23* etc, (BADEA şi SĂNDULESCU, 2001).

În prezent procedeele de obţinere a protoplaştilor prin metoda enzimatică sunt standardizate. Tehnica însă nu este de fel uşoară, pentru că fiecare specie, varietate sau formă de plantă, fiecare ţesut sau sistem celular folosit ca sursă de protoplaşti, prezintă cerinţe particulare, care privesc nu numai procesul în sine de obţinere a lor, ci şi desfăşurarea etapelor următoare, menite să confere acestora viabilitate, capacitate de regenerare a unui nou perete celular, de diviziune şi diferenţiere celulară şi în final, de formare a unui nou organism, (ANGHEL, 1988). Astfel, ţesuturile manifestă specificitate atât în ceea ce priveşte natura enzimei/enzimelor utilizate în digerarea peretelui celular, cât şi în privinţa timpului afectat digestiei, ceea ce îngreunează de la început folosirea pe scară largă a acestei tehnologii. Calitatea enzimelor, tipul de microorganisme utilizat pentru prepararea lor, gradul de purificare a produsului, ca şi stabilizatorul osmotic, prezenţa ionilor de Ca sau Mg, exercită o influenţă deosebită în reuşita tehnologiei.

Durata tratamentului enzimatic al celulelor vegetale se stabileşte prin tatonare. Astfel, incubarea celulelor vegetale în soluţia de enzime se face la întuneric sau la lumină difuză, la temperatură cuprinsă între 25–27^0 C (funcţie de specie), timp de câteva ore (între 2 şi 20). Prin studii la

Scanned with OKEN Scanner

microscopul electronic, se pot identifica forma, structura protoplaştilor şi lipsa peretelui celular, (CACHIŢĂ-COSMA et al., 2004).

După aplicarea tratamentului enzimatic, protoplaştii sunt separaţi de resturile nedigerate, prin filtrarea suspensiei de protoplaşti, iar filtratul se centrifughează în scopul eliminării celulelor sparte sau a celor care mai conţin perete celular. Pentru îndepărtarea soluţiei enzimatice, utilizată în digestia pereţilor celulari, protoplaştii trebuie spălaţi cu o soluţie ce prezintă aceeaşi presiune osmotică (pentru a împiedica spargerea protoplaştilor) şi supuşi la două centrifugări succesive. În final se obţin populaţii omogene de protoplaşti, pregătiţi pentru cultivare pe medii nutritive. Înainte de cultivare, este testată viabilitatea lor, folosindu-se coloranţi vitali - albastrul Evans sau diacetatul de fluoresceină. Cu ajutorul hemocitometrului se poate stabili densitatea lor care se raportează la 1 gram de ţesut vegetal proaspăt, (RAKOSY - TICAN, 1998).

4.1.5.2.Cultura protoplaştilor şi regenerarea plantelor

După reuşita izolării protoplaştilor prin metoda enzimatică, elaborată de COKING, în perioada anilor 1960 - 1970, japonezii NAGATA şi TAKEBE, folosind diferite combinaţii de auxine şi citokinine în diverse medii nutritive, au demonstrat că protoplaştii izolaţi din mezofilul frunzelor de tutun dau naştere după un timp la mici colonii celulare. Aceeaşi echipă, a reuşit în 1971 (pentru prima dată în lume) obţinerea de calus şi regenerarea de plantule din acesta, (ROEST şi GILISSEN, 1989). Au fost apoi raportate tot mai multe succese privind regenerarea de plante din protoplaşti la diferite plante, în special la cele din familia *Solanaceae*. Din cadrul acestei familii, se pare că genurile *Lycopersicon, Nicotiana, Petunia* şi *Solanum* s-au dovedit a fi cele mai responsive în această privinţă.

Regenerarea de noi plante din protoplaşti depinde de: genotipul plantei mamă, ţesutul donor de celule vegetale şi eventualele pretratamente aplicate, tratamentul enzimatic aplicat celulelor pentru izolarea protoplaştilor, metoda de cultivare a lor, mediul de cultură şi unii factori fizici (condiţiile de cultivare). În figura 4.9 sunt prezentate schematic etapele unui protocol de izolare şi cultivare a protoplaştilor şi de regenerare a plantelor din calusuri provenite din protoplaşti.

Scanned with OKEN Scanner

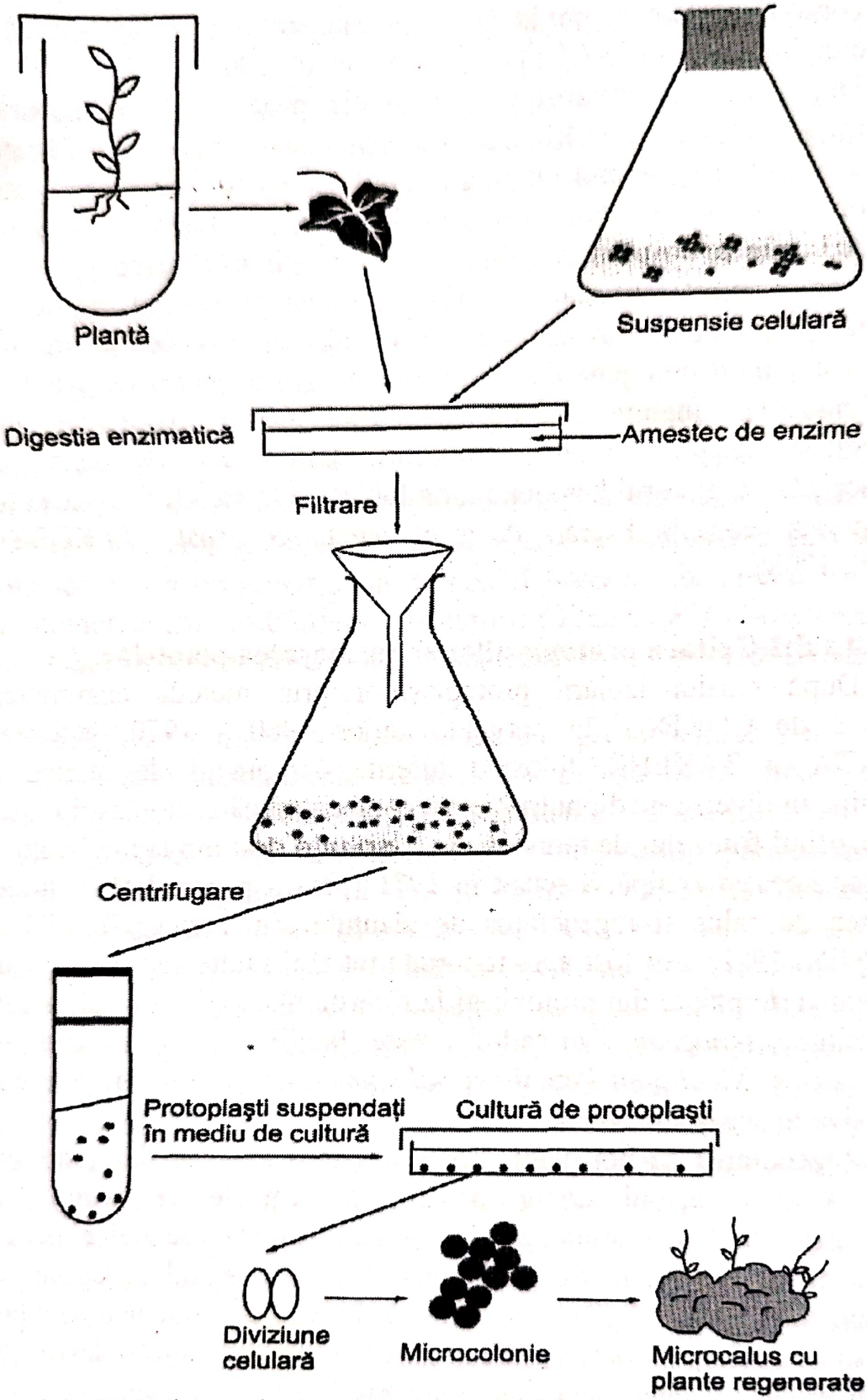


Fig. 4.9. Etapele unui protocol de izolare şi cultură a protoplaştilor şi regenerare a plantelor din calusuri cu originea în protoplaşti

Scanned with OKEN Scanner

Mediul de cultură destinat protoplaştilor trebuie să permită regenerarea peretelui celular, diviziunea celulară, formarea calusului, organogeneza sau embriogeneza. Pentru aceasta, mediul nutritiv adecvat, va cuprinde: un stabilizator osmotic (până la refacerea peretelui celular), nutrienţi anorganici, surse de carbon, vitamine, azot organic, regulatori de creştere şi un pH cuprins între 5,5 şi 5,8. Datorită absenţei peretelui celular şi permeabilităţii foarte ridicate a membranei plasmatice a protoplaştilor, mediul nutritiv trebuie să fie mai diluat pentru a evita autointoxicarea lor. La majoritatea speciilor, după câteva ore, protoplaştii regenerază peretele celular, iar primele diviziuni celulare au loc în mod normal după 2 - 7 zile. În prima etapă de cultivare trebuie să se ajusteze densitatea protoplaştilor în mediu, prin numărarea lor cu hemocitometrul. În general, densitatea se reglează între 0,5 şi 2,0 x 10^5 protoplaşti /ml de mediu.

Pentru formarea calusului din protoplaşti cel mai frecvent se utilizează mediile KAO şi MICHAILUK (1975), iar pentru inducerea embriogenezei se recomandă mediile MS (MURASHIGE-SKOOG, 1962) sau B_5 (GAMBORG et. al., 1968).

BADEA et al., (2001) prezintă mai multe posibilităţi de cultivare a protoplaştilor:

- suspendarea lor într-un strat subţire de mediu lichid, într-un vas Petri;
- cultivarea lor în „picătură suspendată" – micropicături de 20-40 ml, plasate pe capacul unui vas Petri (în vas se pune apă sau mediu);
- cultivarea acestora în micropicături de mediu lichid, plasate în vase Petri;
- suspendarea protoplaştilor în mediu lichid, aflat la suprafaţa unui mediu solid;
- imobilizarea lor în agar, agaroză sau alginat.

Succesul culturii de protoplaşti depinde, aşa cum aminteam anterior, şi de condiţiile de cultivare a acestora. Astfel, dintre factorii fizici care influenţează creşterea şi dezvoltarea lor, fac parte:

- *lumina*, care exercită efect inhibitor asupra diviziunii celulare în primele etape, fapt ce impune plasarea culturilor de protoplaşti la întuneric sau în lumină difuză;

Scanned with OKEN Scanner

- *temperatura*; incubarea culturii se face la temperatură relativ constantă, cuprinsă între 24 – 26^{0}C.

CACHIȚĂ-COSMA et al. (2004) citează unele metode cu rol în stimularea capacității morfogenetice a protoplaștilor, cum ar fi:

- electrostimularea, care constă în plasarea lor în câmpuri electrice de intensitate joasă pentru câteva milisecunde. Tratamentul stimulează diviziunea, creșterea coloniilor de celule și inducerea morfogenezei;
- oxigenarea culturilor, care presupune îmbogățirea în oxigen a atmosferei din vasul de cultură și care determină o capacitate de regenerare mai bună a coloniilor celulare;
- utilizarea perfluorocarbonilor (compuși lichizi, inerți), care au capacitatea de a dizolva gazele respiratorii și de a stimula morfogeneza protoplaștilor;
- folosirea soluțiilor de hemoglobină de origine bovină, care stimulează capacitatea de diviziune a protoplaștilor.
- utilizarea de inhibitori ai etilenei (azotatul de argint, clorura de cobalt), care stimulează organogeneza la nivelul calusului derivat din protoplaști.

După aproximativ trei săptămâni de la cultivarea protoplaștilor, prin diviziuni repetate, se formează o colonie celulară ce va da naștere unui calus. Transferat pe medii adecvate, acest calus poate fi obligat să diferențieze, iar într-un interval de 4 - 6 luni să genereze plante mature.

Regenerarea plantelor din protoplaști se face prin organogeneză indirectă *via calus* (*Solanaceae*), sau embriogeneză somatică (*Capsicum, Medicago, Trifolium, Brassica, Prunus, Pyrus* etc). Procesul este puternic influențat de unii factori, despre care s-a mai discutat: genotipul plantei mamă, condițiile în care a fost cultivată aceasta, vârsta și starea fiziologică a țesutului folosit ca sursă de protoplaști, eventualele pretratamente aplicate, tipul și concentrația enzimelor utilizate în digestia peretelui celular, timpul afectat acestei operațiuni, mediile nutritive pentru cultivarea protoplaștilor și pentru regenerarea noilor plante și nu în ultimul rând condițiile fizice ale cultivării protoplaștilor.

În concluzie, tehnologia de izolare a protoplaștilor și regenerarea de noi plante din aceștia, nu este simplă. Ea este complexă și particulară fiecărei specii, varietăți sau forme de plantă. Acest lucru reiese și din cercetările efectuate de BINDING și colaboratorii (1988), care au

Scanned with OKEN Scanner

verificat capacitatea regenerativă a protoplaştilor izolaţi la 77 specii de dicotiledonate, în condiţii experimentale asemănătoare. Studiul a demonstrat că la 54 dintre specii protoplaştii au regenerat peretele celular, la 35 dintre acestea noile colonii celulare au format calus, şi doar la 21 dintre specii s-a reuşit obţinerea de lăstari sau neoplantule.

4.1.5.3. Obţinerea de hibrizi somatici la plante

Hibridarea somatică reprezintă una din marile cuceriri ale sfârşitului secolului al XX-lea, care a permis învingerea barierelor reproductive dintre specii. Hibrizii somatici sunt celule mononucleate rezultate din contopirea protoplaştilor, proveniţi de la specii care nu se pot încrucişa pe cale sexuată.

În 1939, MICHEL (citat după ANGHEL, 1988) raporta realizarea primelor fuziuni interspecifice de protoplaşti, numai că cercetările au stagnat o perioadă lungă de timp după aceea. Odată cu elaborarea unor metode mai sigure şi mai eficiente de obţinere a protoplaştilor şi a regenerării de plante din aceştia, s-a ivit ideea identificării unor tehnici de fuziune a protoplaştilor, pentru obţinerea de hibrizi somatici, mai ales între specii la care hibridarea sexuată nu este posibilă. Primele încercări în acest sens au fost realizate de CARLSON et al. (1972) şi de COCKING (1974), care au demonstrat posibilitatea fuziunilor interspecifice de protoplaşti la tutun (*Nicotiana glauca* x *Nicotiana langsdorfii*) şi la petunie (*Petunia hybrida* x *Petunia parodii*). Perfecţionarea modalităţilor de hibridare somatică se datorează cercetărilor efectuate de KELLER şi MELCHERS (1975), ERIKSSON et al. (1974), KAO şi MICHAYLUK (1974), care au realizat primele experimente reuşite de obţinere de plante hibride, prin fuziuni de celule somatice. Pentru inducerea fuziunii protoplaştilor s-au folosit ionii de Ca^{2+}, la 37^0 C şi pH de 10,5.

Până în prezent s-au descris în literatura de specialitate un număr mare de hibrizi somatici, majoritatea intra- şi interspecifici, intergenerici şi chiar hibrizi între specii aparţinând la familii diferite. Pe cale sexuată, încrucişările interspecifice sau intergenerice nu generează embrioni viabili, datorită unei inhibiţii specifice sau blocării unor etape cheie în: polenizare, creşterea tubului polinic, fertilizarea embrionului sau endospermului, (RAICU şi BADEA, 1986).

Scanned with OKEN Scanner

Obţinerea hibrizilor somatici este unul din obiectivele importante ale programelor de ameliorare a plantelor cultivate, deoarece încrucişarea unor genitori care posedă caracteristici genetice diferite poate conduce la crearea unor noi combinaţii nucleo-plasmatice, având ca rezultat obţinerea unui material biologic valoros, ce reuneşte însuşiri economice superioare ambelor linii parentale. Introducerea de ADN, de organite, de celule bacteriene sau algale în protoplaştii plantelor superioare, oferă noi şi eficiente modalităţi de studiere a interacţiunilor dintre nucleu şi organite sau dintre nucleu şi citoplasmă, servind totodată la transferul intergeneric al unor procese sau caracteristici utile pentru practică, (ROŞU, 1988).

Fuziunea protoplaştilor poate avea loc spontan, ori poate fi indusă prin diferite metode. Fuziunea spontană a doi sau mai mulţi protoplaşti are loc în momentul degradării peretelui celular, în soluţia enzimatică. Fenomenul este întâlnit numai între celulele provenite din acelaşi ţesut, fuziunea fiind strict intraspecifică, formându-se *homocarioni*. Aceştia se pot divide şi pot regenera plante. Fuziunea spontană a fost observată, de exemplu, între protoplaştii de tutun, sau între protoplaştii de *Datura innoxia*.

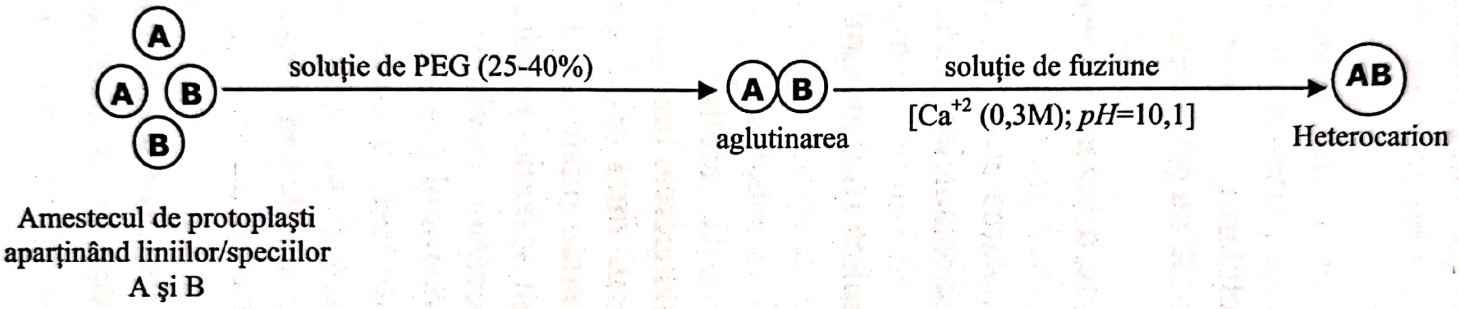
Fuziunea indusă constă în utilizarea unor agenţi fizici sau chimici. Unele substanţe chimice asigură fuzionarea protoplaştilor, fie prin dezorganizarea parţială a plasmalemei, fie prin modificarea parametrilor fizico-chimici ai membranei externe a protoplaştilor, favorizând contactul intim între membranele protoplaştilor. Agenţii chimici utilizaţi în fuziune pot fi: nitratul de sodiu ($NaNO_3$), ionii de calciu în soluţii cu pH ridicat, polietilen glicolul (PEG) şi izolecitina combinată cu PEG. Metoda chimică utilizată mai frecvent este cea pe bază de PEG, în prezenţa ionilor de Ca^{2+}, la un pH ridicat, (Fig. 4.10).

În 1981, ZIMMERMAN ŞI SCHEURICH au pus la punct o nouă tehnică, ce recurge la fuziunea celulelor într-un câmp electric neuniform, (fig. 4.10). Este vorba de electrofuziunea nucleară, care s-a dovedit mult mai eficientă decât fuziunea mediată de PEG.

Procesul de fuziune începe prin contactul strâns între plasmalemele protoplaştilor, la nivelul cărora, în anumite puncte de contact se formează punţi citoplasmatice, urmând apoi amestecul componenţilor celor doi protoplaşti. Se formează un *dikarion* care conţine un amestec de citoplasme cu nucleii celulelor parentale.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda chimică



Metoda fizică

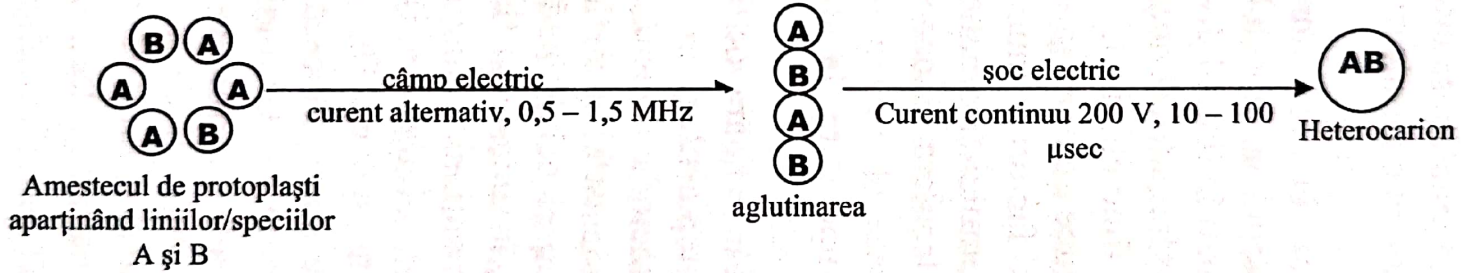


Fig. 4.10. Reprezentarea schematică a metodelor utilizate în inducerea fuziunii protoplaştilor (după BADEA şi SĂNDULESCU, 2001).

Scanned with OKEN Scanner

Dacă protoplaştii provin de la aceeaşi specie, fiind identici din punct de vedere genetic, atunci dikarionul se numeşte *homocarion*, iar dacă provin de la specii diferite, rezultatul este un *heterocarion*. În urma contopirii citoplasmelor, pot fuziona şi nucleii, rezultând astfel un *sinkarion*, deci un hibrid somatic.

Hibrizii somatici pot fi:

- *simetrici*, când nucleii şi citoplasmele parentale fuzionează în întregime, rezultând celule cu organite celulare moştenite de la ambii părinţi;
- *asimetrici*, caz în care unul din genomurile parentale este reprezentat parţial în hibridul rezultat (o parte din cromozomii lui sunt eliminaţi în timpul diviziunii celulare);
- *cibrizi*, la care fuzionează doar citoplasma, nu şi nucleii, unul din cei doi nuclei fiind eliminat.

Procesul de fuziune celulară şi de formare a heterocarionilor este influenţat de mai mulţi factori şi anume:

a) durata tratamentului enzimatic pentru izolarea protoplaştilor;
b) greutatea moleculară şi concentraţia substanţelor chimice care induc fuziunea;
c) durata şi temperatura la care se aplică tratamentul pentru fuziune;
d) pH-ul soluţiei în care are loc fuziunea;
e) densitatea protoplaştilor.

Indiferent de metoda folosită pentru inducerea fuziunii, nu toţi protoplaştii fuzionează, astfel încât în amestecul final pe lângă hibrizi somatici sunt prezente şi celule nude nefuzionate, aparţinând ambilor părinţi. De asemenea, în amestecul final hibrizii somatici rezultaţi pot fi de cele două tipuri menţionate anterior: homocarioni (celule fuzionate care aparţin doar uneia dintre specii) şi heterocarioni (celule fuzionate care aparţin celor două specii). Din acest motiv este necesară selecţia produşilor de fuziune, care urmează a fi cultivaţi pe medii adecvate pentru refacerea peretelui celular, multiplicarea şi diferenţierea celulelor hibride. Procesul de selecţie întâmpină o serie de dificultăţi, datorită frecvenţei scăzute a obţinerii de heterocarioni, ca şi a capacităţii lor reduse de supravieţuire şi dezvoltare. Selecţia hibrizilor somatici se poate face direct (prin vizualizarea lor), sau indirect, pe baza diferenţelor

Scanned with OKEN Scanner

fenotipice sau de creştere existente între celulele hibride şi celulele parentale.

În cazul selecţiei indirecte, CACHIŢĂ – COSMA et al. (2004), enumeră câteva metode ce pot fi practicate şi anume:

- *selecţia prin complementaţie*. În acest caz sunt izolaţi hibrizii somatici care manifestă fenotip normal (sălbatic) şi rezultă din fuziunea protoplaştilor proveniţi de la două mutante (care prezintă, de exemplu, deficienţe clorofiliene sau auxotrofie). S-a constatat că selecţia prin complementaţie cu ajutorul mutantelor auxotrofe este mai eficientă decât cea care utilizează mutante clorofiliene, deoarece asigură numai supravieţuirea liniilor hibride;

Protoplaşti Albino aR + Protoplaşti tip sălbatic Ar → Hibrizi somatici verde AaRr

Protoplaşti Auxotrofi aR + Protoplaşti tip sălbatic Ar → Hibrizi somatici autotrofi AaRr

- *selecţia cu ajutorul factorilor de rezistenţă*. Această metodă constă în izolarea hibrizilor somatici dublu rezistenţi, obţinuţi în urma fuziunii protoplaştilor izolaţi de la două linii rezistente, fiecare la câte un compus diferit;
- *selecţia pe baza modului diferit de creştere*. Metoda se bazează pe capacitatea de creştere a hibrizilor somatici pe diferite medii de cultură. Deoarece este necesară cunoaşterea modului de creştere a acestora, tehnica este aplicabilă numai în cazul speciilor între care este posibilă şi hibridarea sexuată. Urmărind modul de dezvoltare a hibrizilor obţinuţi pe cale sexuată pe diferite medii de cultură, se selectează hibrizii somatici comparând creşterea lor cu cea a hibrizilor sexuali. Un astfel de sistem a fost aplicat hibrizilor somatici de *Petunia hybrida* x *Petunia parodii*. POWER et al. (citaţi după BADEA şi RAICU, 1984), au constatat că pe mediul de cultură utilizat protoplaştii de *Petunia hybrida* nu se puteau divide, cei de *P. parodii* formau coloni mici, pe când celulele hibride dintre cele două specii creşteau şi formau calusuri;
- *selecţia pe baza morfologiei şi a creşterii intensive*. Metoda se bazează pe faptul că hibrizii somatici ai unor specii prezintă morfologie anormală, iar calusurile sau lăstarii dezvoltaţi din

Scanned with OKEN Scanner

aceştia au aspect sau structură diferită de formele parentale. Datorită fenomenului heterozis, calusul dezvoltat din hibrizii somatici se caracterizează printr-o creştere şi dezvoltare intensă.

După selecţia heterocariocitelor, pentru evidenţierea naturii hibride a plantelor obţinute prin tehnica fuziunii de protoplaşti, pot fi utilizate mai multe metode:

- studiul citogenetic al plantelor/liniilor celulare hibride;
- analiza unor izoenzime;
- analiza unor markeri citoplasmatici;
- analiza genelor ribozomale;
- studiul morfologic comparativ al hibrizilor somatici şi sexuali.

Până în prezent s-au descris în literatura de specialitate un număr relativ mare de hibrizi somatici, majoritatea intra- şi interspecifici, dar şi intergenerici şi interfamilii, (BINDING şi colab., 1986). Hibrizi intraspecifici au fost raportaţi mai ales la speciile genurilor: *Datura, Hyoscyamus, Nicotiana, Petunia, Daucus*, iar dintre heterocarionii realizaţi prin fuziuni interspecifice şi intergenerice de protoplaşti prezentăm câteva exemple în tabelul 4.4.

Tabel 4.4. Hibrizi somatici produşi prin fuziune de protoplaşti (după HARMS, 1983)

HIBRIZI INTERSPECIFICI			Autorii
Genul *NICOTIANA*			
Nicotiana glauca	x	*N. langsdorffi*	Carlson, 1972; Smith, 1976; Chupeau, 1978
N. tabacum	x	*N. sylvestris*	Evans et. al, 1983
N tabacum	x	*N. knightiana*	Maliga et al, 1978; Mencyel et al, 1981
N. tabacum	x	*N. glauca*	Evans et al, 1980; Nagao et al, 1979
N. sylvestris	x	*N. knightiana*	Maliga et al., 1977; Menczel, 1981
N. sylvestris	x	*N. rustica*	Gleed et. al., 1983
N. tabacum	x	*N. glutinosa*	Uchimiya et al, 1982; Horn et al., 1983
Genul *PETUNIA*			
P. parodii	x	*Petunia hibrida*	Power et al, 1976; Cocking et al, 1977
P. parodii	x	*P. inflata*	Power et al, 1979
P. parodii	x	*P. parviflora*	Power et al, 1980

Scanned with OKEN Scanner

Genul *DAUCUS*			
Daucus carota	x	*D. capillifolius*	Dudits et al, 1977; Kameya et al, 1981
Genul *BRASSICA*			
Brassica oleracea, var. capitata	x	*B.campestris var.narinosa*	Schenck şi Röbbelen, 1982
Brassica oleracea, var. capitata	x	*B.campestris var.perviridis*	Schenck şi Röbbelen, 1982
HIBRIZI INTERGENERICI			
Atropa belladona	x	*Petunia hybrida*	Gosch şi Reinert, 1978
Atropa belladona	x	*Nicotiana chinensis*	Gleba et al., 1982
Arabidopsis thaliana	x	*Brassica campestris*	Gleba şi Hoffmann, 1980; Hoffmann şi Adachi, 1981
Solanum tuberosum	x	*Lycopersicon esculentum*	Melchers et al., 1978
Daucus carota	x	*Petroselinum hortense*	Dudits et al., 1980
Daucus carota	x	*Aegypodium podagraria*	Dudits et al., 1981

4.1.5.4. Importanța tehnologiei de fuziune a protoplaştilor la plante

Meritul acestei tehnologii constă în posibilitatea obținerii de hibrizi somatici între specii înrudite sau îndepărtate din punct de vedere filogenetic, prin depăşirea barierelor impuse de incompatibilitatea sexuală naturală a speciilor. Se creează astfel posibilitatea realizării unor noi combinații nucleo-plasmatice, iar organismele obținute conțin informații genetice noi, care conferă noi caracteristici, imposibil de realizat prin metodele clasice de hibridare. Cercetările de până acum au pus la punct metode eficiente de izolare a protoplaştilor, de fuziune a lor, precum şi de identificare precoce a hibrizilor somatici. Reuşitele în acest domeniu nu sunt atât de numeroase şi de spectaculoase pe cât au fost aşteptările şi ele s-au dovedit posibile în special la aşa numitele „plante model": *Nicotiana, Petunia, Daucus* şi *Datura.*

Tehnica de fuzionare a protoplaştilor şi de regenerare a plantelor din hibrizii somatici, al căror genom înglobează gene ale ambelor specii parentale, prezintă importanță atât teoretică, cât şi aplicativă, contribuind la:

Scanned with OKEN Scanner

- creşterea variabilităţii genetice şi izolarea de genotipuri rezistente la diferite condiţii vitrege de viaţă, precum şi la unele boli.
- obţinerea de plante cu eficienţă sporită a fotosintezei, cu sisteme enzimatice şi metabolice modificate;
- selectarea unor linii celulare stabile, producătoare de principii active utile;
- producerea unor forme hibride puternic asimetrice, care conţin numai câteva gene de la unul din parteneri, gene care conferă caractere utile în practică.
- obţinerea unor plante care să conţină o categorie de gene citoplasmatice (de exemplu genomul cloroplastic) de la un partener, şi o categorie de gene citoplasmatice de la alt partener (genomul mitocondrial);
- resinteza pe cale artificială a unor amfiploizi naturali, cum este cazul hibridului somatic *Brassica napus* (2n = 38) prin fuziunea protoplaştilor izolaţi de la *Brassica oleracea* (2n = 18) şi *Brassica campestris* (2n = 20);
- obţinerea de hibrizi somatici fertili (care produc seminţe). Acest lucru are importanţă practică deosebită din punct de vedere economic. Până în prezent majoritatea hibrizilor somatici obţinuţi între specii cu valoare economică nu sunt fertili (*Brassica oleracea* x *Raphanus sativus* = *Raphanobrassica)*. Obţinerea de hibrizi somatici fertili a avut loc între specii incompatibile sexual ale genului *Petunia*;
- obţinerea de plante din hibrizi somatici, care prezintă caractere diferite comparativ cu plantele regenerate din hibrizii sexuali ai aceloraşi specii parentale. EVANS et al. (1982) au făcut un studiu comparativ între hibrizii obţinuţi pe cale sexuată şi cei somatici între *Nicotiana tabacum* şi *Nicotiana nesophilla* şi au remarcat variaţii semnificative între clonele hibrizilor somatici şi ale celor sexuaţi. Cum toate clonele au prezentat număr constant de cromozomi (2n=96), variabilitatea a fost considerată ca fiind rezultatul materialului genetic prezent în citoplasmă, sau al unor recombinări mitotice ale genelor nucleare, ori datorită unor rearanjamente cromozomiale, (ANGHEL, 1988);

Scanned with OKEN Scanner

- transferul genomului citoplasmatic răspunzător de androsterilitate, o problemă importantă în producerea de sămânță hibridă.

Aşa cum s-a menționat deja, s-au obținut hibrizi somatici îndepărtați în special la cinci genuri de plante: *Nicotiana*, *Datura*, *Solanum*, *Petunia* şi *Daucus*, (TORREY, 1985). Sunt de asemenea cunoscuți hibrizii somatici între *Arabidopsis thaliana* şi *Brassica campestris*, denumiți *Arabidobrassica*. De un interes special s-a bucurat reuşita fuziunii dintre o linie dihaploidă de cartof cu una diploidă de tomate, hibridul obținut fiind botezat *Pomato*. Din nefericire, deşi aceşti hibrizi înglobau caractere de la speciile genitoare, nu s-au dovedit a avea valoare comercială. În 1987, YAMADA et al. au reuşit fuziunea protoplaştilor proveniți din linii înalt producătoare de principii active de *Coptis japonica* şi *Euphorbia millii*; heterocarionii obținuți au fost cultivați într-o stație pilot şi prezentau fluorescență galbenă (produceau berberină) când erau cultivați la întuneric şi culoare roşie (produceau antociani) când erau expuşi la lumină.

Hibridările somatice au depăşit nu numai granițele de familie, ci chiar pe cele de regn. S-au efectuat astfel de hibridări şi între celule vegetale şi animale, cum ar fi: între celule umane tumorale *HeLa* şi protoplaşti de morcov sau tutun, între celule de şoarece şi celule vegetale etc. Nucleul celulei umane s-a integrat în celula de tutun, ba chiar s-au produs unele diviziuni, aparent anormale. Cei care se aşteaptă la obținerea unor organisme care să reunească unele caractere de la cele două categorii de organisme, mai au de aşteptat. Atunci, care este rolul unor astfel de experiențe!? Hibridările de acest gen ne ajută să descifrăm mai bine tainele eredității citoplasmatice, ale raporturilor nucleo-plasmatice, să realizăm transferuri de organite şi de ADN exogen de la o specie la alta prin intermediul protoplaştilor, să aflăm informația genetică specifică unor cromosomi etc. Totodată, tehnica promite şi sub aspect aplicativ, prin transferul mediat de protoplaşti a unor însuşiri valoroase de la o specie la alta (androsterilitatea, rezistența la factori biotici şi abiotici etc), (GHIORGHIȚĂ şi ONISEI, 1990; GHIORGHIȚĂ, 1999).

4.1.6. Haploidia experimentală la plante şi implicațiile ei

Haploidia este o stare specifică procariotelor şi mai puțin întâlnită la eucariote. În acest caz, a fost observată mai frecvent la unele alge monocelulare, ciuperci, muşchi. Uneori însă haploidia a fost depistată şi

Scanned with OKEN Scanner

la unele animale (mai ales la insecte), dar şi la plantele superioare (în special angiosperme). Organismele haploide au în celulele lor un număr înjumătăţit de cromosomi (n), numărul specific gameţilor. Datorită faptului că organismele haploide (monoploide) posedă un singur set de cromosomi, în fiecare poziţie a unei gene din cromosom (locus) este prezentă doar o singură alelă. Un astfel de organism se află într-o stare specială, cea de hemizigoţie. Această stare permite manifestarea fenotipică a tuturor genelor prezente în cromosomi, existând o concordanţă deplină între genotip şi fenotip.

În natură haploidia poate apare pe următoarele căi:

- partenogeneză (ginogeneză) - organismul se dezvoltă dintr-un ovul sau oosferă nefecundată;
- androgeneză - organismul se formează dintr-o celulă sexuală masculă;
- apogamie - organismul apare dintr-o celulă haploidă a sacului embrionar la plante.

Frecvenţa haploidiei la plante a fost apreciată de către RIEGER (1963) la cca 0,025 - 0,037 % la bumbac, cca 0,018 % la laur, cca 0,05 % la porumb, cca 0,01 % la cavaleri, cca 0,025 % la grâu etc, (GHIORGHIŢĂ, 1999). Primii haploizi la plantele superioare au fost descrişi la *Datura stramonium* (în 1922), *Nicotiana tabacum* (în 1924), *Triticum aestivum* (în 1926) etc.

Impactul practic deosebit al haploizilor şi anume cel al obţinerii într-un timp incomparabil mai scurt al liniilor izogene comparativ cu metoda clasică de purificare a materialului biologic a determinat o activitate susţinută pentru identificarea de tehnici pentru inducerea haploidiei. Până la descoperirea androgenezei şi ginogenezei experimentale s-a apelat la o serie de metode ca:

- înlăturarea staminelor la florile hermafrodite, acţiune care uneori conduce la intrarea în diviziune a oosferei sau a celulelor haploide din sacul embrionar. Prin această tehnică KIHARA (1941) a obţinut cu o frecvenţă ridicată (37,5%) haploizi la *Triticum monoccocum;*
- polenizarea cu polen iradiat cu doze inactivante de radiaţii ionizante, care induce o pseudofertilizare (pseudogamie) şi dezvoltarea unor oosfere în embrioni haploizi. Metoda a asigurat obţinerea la *Tr. monoccocum* de până la 20% haploizi;

Scanned with OKEN Scanner

- folosirea la polenizare de polen străin (provenit totuşi de la specii înrudite), acţiune care de asemenea provoacă dezvoltarea prin ginogeneză a unor oosfere nefecundate. În acest mod a obţinut JOERGENSEN (1928) haploizi la *Solanum nigrum* (prin polenizarea cu polen de la *S. luteum*).
- specularea fenomenului de poliembrionie, unii din aceşti embrioni fiind haploizi. Este o metodă practicată cu succes de MUNTZING (1961), care a obţinut în acest fel haploizi la 16 specii de plante, (GHIORGHIŢĂ, 1999).

Progresele înregistrate în domeniul culturilor *in vitro* după 1960 au dus la identificarea şi a altor metode de obţinere a haploizilor în afara andro- şi ginogenezei experimentale:

- specularea variabilităţii somaclonale care apare în cultura de ţesuturi şi celule vegetale;
- cultura de embrioni zigotici care rezultă din încrucişări interspecifice, în care este expulzat unul din seturile de cromosomi (de regulă cel patern). Cele mai bune rezultate s-au obţinut prin folosirea acestei tehnici în ameliorarea speciei *Hordeum vulgare* în încrucişări interspecifice cu *H. bulbosum* (formă paternă), de unde numele de metoda *bulbosum*;
- cultura de protoplaşti proveniţi din ţesuturi haploide şi regenerarea de plante din aceştia, (ONISEI şi GHIORGHIŢĂ, 1990).

Haploidia antrenează o serie de repercursiuni asupra organismelor afectate, cele mai importante fiind reducerea volumului nucleului şi al celulelor, fapt care are drept consecinţă o talie mai mică a organismelor respective (nanism). Totodată, au loc perturbări ale meiozei care determină o repartiţie inegală a cromosomilor în celulele sexuale, ceea ce duce la sterilitatea lor totală sau aproape totală. La plantele alogame efectele haploidiei sunt şi mai puternic exprimate decât la cele autogame, starea haploidă permiţând manifestarea unor mutaţii recesive cu efect dăunător asupra organismului.

Pe baza gradului de ploidie a speciilor din care provin, s-au elaborat mai multe sisteme de clasificare a haploizilor. Potivit clasificării lui KIMBER şi RILEY (1963), haploizii sunt împărţiţi în două mari grupe: *euhaploizi* şi *aneuhaploizi*. Euhaploizii posedă numărul de bază (x) al cromosomilor sau un multiplu al acestuia, în funcţie de nivelul de

Scanned with OKEN Scanner

ploidie a speciei de la care provin. Haploizii speciilor diploide (2n) se numesc *monoploizi* sau *monohaploizi* şi au un singur set de bază de cromosomi (x), iar cei care derivă din specii poliploide se numesc *polihaploizi*, având deci mai multe seturi de bază ale cromosomilor.

Aneuhaploizii posedă un număr de cromosomi ce diferă prin unul sau mai mulţi faţă de cel specific stării haploide la o anumită specie.

Pentru activitatea de ameliorare a plantelor, inducerea, depistarea şi perpetuarea haploizilor este de mare interes, deoarece asigură stabilizarea mult mai rapidă a unor caractere utile în descendenţă. Astfel, se evită parcurgerea drumului clasic, de „purificare" a materialului biologic prin consangvinizarea repetată, care presupune un mare efort, cheltuieli importante şi derularea experimentului pe mai multe generaţii. Din această cauză a apărut interesul cercetătorilor de a găsi metode pentru inducerea haploidiei la plante.

În primele decenii ale secolului trecut s-au căutat metode de inducere *in vivo* a haploidiei (prezentate anterior), numai că acestea s-au dovedit a avea o eficienţă scăzută. Cu timpul au început să fie perfecţionate tehnici care presupun obţinerea unor organisme haploide prin: cultura *in vitro* a anterelor şi a polenului (*androgeneza experimentală*), cultura *in vitro* a ovarelor şi ovulelor nefecundate (*ginogeneza experimentală*), specularea variabilităţii somaclonale care apare în culturile de ţesuturi şi celule vegetale, cultivarea embrionilor zigotici rezultaţi din încrucişări interspecifice asociată frecvent cu eliminarea unuia din seturile de cromosomi (de regulă cel patern), cultivarea de protoplaşti plecând de la celule haploide urmată de regenerarea plantelor din aceştia etc, (ONISEI şi GHIORGHIŢĂ, 1990).

4.1.6.1. Androgeneza experimentală

Androgeneza experimentală reprezintă o tehnică de obţinere a plantelor haploide prin cultivarea *in vitro* a gametofitului mascul în condiţii speciale care favorizează dezvoltarea celulelor gametofitului, şi formarea de plante haploide, în celulele cărora se află complementul cromosomial al unui singur părinte, respectiv al celui masculin. *Androgeneza* sau *partenogeneza masculină* constă în dezvoltarea unui embrion, şi apoi a unui individ haploid, dintr-o celulă sexuală mască. Individul astfel generat va avea în celulele corpului numai setul de cromosomi al gametului mascul. Prin androgeneză, dezvoltarea polenului

Scanned with OKEN Scanner

este dirijată (forțată) către embriogeneză, evitându-se astfel calea sexuată normală.

Pentru inducerea unei devieri a programului normal de dezvoltare a gametofitului mascul există trei procedee: cultura de antere, cultura de inflorescențe și cultura de polen.

Cultura de antere este metoda cea mai veche și mai frecvent utilizată. Posibilitatea de obținere a plantelor haploide prin cultura *in vitro* a anterelor a fost descoperită la *Datura innoxia* de către GUHA și MAHESHWARI (1964, 1966) și apoi la *Nicotiana tabacum* de către BOURGIN și NITSCH (1967).

Cultura de inflorescențe, de utilitate limitată față de cultura de antere, poate fi folosită la specii care produc flori mici și cu periant redus.

Cultura de polen a fost aplicată la câteva specii de *Solanaceae* și implică o perioadă de precultură a anterelor, pentru a împiedica degenerarea polenului după izolare.

Importanța haploizilor pentru activitatea de ameliorare a făcut ca androgeneza experimentală *in vitro* să fie practicată la un număr mare de specii (la nivelul anului 1988 erau deja menționate 237 specii - aparținând la 83 genuri și 37 familii, la care se indusese androgeneza potrivit informațiilor lui DIEU și DUNWELL, 1988), cele mai multe fiind de interes economic.

În general se urmărește elaborarea unui protocol experimental care să asigure numai dezvoltarea polenului, nu și a țesuturilor somatice înconjurătoare. Din punctul de vedere al evenimentelor care se petrec în timpul diviziunii polenului cultivat *in vitro*, plantele se împart în două categorii:

- plante care urmează calea androgenezei directe, caz în care polenul funcționează ca zigot și trece prin stadii asemănătoare celor din embriogeneza zigotică. Prin ruperea peretelui grăunciorului de polen (aflat în stadiul globular), embrionii sunt eliberați și după 1 - 2 luni ies din anteră plăntuțe cu cotiledoane;
- plante (mai ales *Gramineae*) la care polenul se divide anarhic și formează mai întâi un calus care străpunge peretele anterei. Din acesta, cel mai adesea apar rădăcini și lăstari, uneori înregistrându-se și fenomenul de embriogeneză secundară.

Scanned with OKEN Scanner

A. *Factori care controlează androgeneza la plante*

În ultimul timp au fost identificaţi numeroşi factori care influenţează producţia de plante din polen. Se consideră că răspunsul anterelor în cultură este unul complex, constituit din componente cu determinism genetic, dar şi din factori epigenetici.

a) *Factori genetici*

Apariţia haploizilor în natură, ca şi capacitatea microsporilor de a forma embrioizi sau calus *in vitro*, sunt controlate genetic şi sunt determinate de diferenţele genotipice existente între plantele donor. Diferitele genotipuri reacţionează diferenţiat, obţinerea plantelor haploide prin androgeneză experimentală fiind deci condiţionată de acest factor.

S-a constatat că reacţia *in vitro* a anterelor diferă nu numai la speciile din cadrul unui gen, ci chiar între variatăţile aceleiaşi specii (tabelul 4.5). În cadrul unor specii ca tomatele, viţa de vie, porumbul, orzul, grâul, etc, reacţia androgenetică *in vitro* a fost strict dependentă de genotip. În cazul cerealelor, genotipul influenţează reacţia calusogenetică a anterelor, capacitatea de organogeneză (diferenţiere) a calusului şi numărul de cromosomi la regeneranţi, (RAICU şi BADEA, 1991).

Au fost identificate următoarele etape cu determinism genetic independent:

- inducerea calusului;
- stabilizarea calusului;
- inducerea caulogenezei sau a embriogenezei somatice la nivelul calusului;
- formarea plantelor verzi, (FOROUGHI - WEHR et al., 1985).

Tabelul 4.5. Specii de angiosperme la care a fost raportată obţinerea de plante cu origine androgenetică (după PRISECARU, 1997)

Nr. crt.	Specia	Referinţe bibliografice
1.	*Aegilops*	Kimata şi Sakamote (1972)
2.	*Arabidopsis thaliana*	Greshoff şi Doy (1972)
3.	*Asparagus officinalis*	Feletier et al. (1972)
4.	*Beta vulgaris (2n=4x=36)*	Breeding lab. Heilingchiang; Sugarbeet Institute (1973)
5.	*Beta vulgaris (2n=2x=18)*	Shae (1979)

Scanned with OKEN Scanner

6.	*Brassica campestris*	Keller et al., (1975); Keller şi Armstrong (1979)
7.	*Brassica chinesis*	Chung et al. (1977)
8.	*Brassica oleracea*	Kameya şi Hinata (1970)
9.	*B. oleracea x B. alboglabra*	Kameya şi Hinata (1970)
10.	*Brassica pekinesis*	Teng şi Kuo (1977)
11.	*Capsicum annuum*	Wang (1973); Novak (1974); Sibi et al. (1979)
12.	*Datura innoxia (2n=2x=24)*	Guha şi Maheshawari (1966); Geier şi Kohlenbach (1973)
13	*Datura innoxia (n=x=12)*	Badea şi Raicu (1982)
14.	*Datura innoxia (3n=3x=36)*	Badea şi Raicu (1982)
15.	*Datura innoxia (4n=4x=48)*	Badea şi Raicu (1983)
16.	*Datura innoxia (6n=6x=72)*	Badea şi Raicu (1983)
17.	*Datura metel (2n=2x=24)*	Narayanaswamy şi Chandy (1971)
18.	*Datura metel (n=x=12)*	Narayanaswamy şi Chandy (1971)
19.	*Datura metel (3n=3x=36)*	Narayanaswamy şi George (1974)
20.	*Datura meteloides*	Kohlenbach şi Geier (1972); Nitsch (1972)
21.	*Datura muricata*	Nitsch (1972)
22.	*Datura stramonium*	Guha şi Maheshawari (1967)
23.	*Datura wrightii*	Kohlenbach şi Geier (1972)
24.	*Digitalis purpurea*	Corduan şi Spix (1975)
25.	*Fragaria virginiana*	Rosati şi col. (1975)
26.	*Freesia sp.*	Bajaj şi Pierik (1974)
27.	*Gerbera jamesonii*	Preil şi col. (1977)
28.	*Geranium horterum*	Abo-El-Nil şi Hildebrandt (1973)
29.	*Hevea brasiliensis*	Chen et al. (1977;1982)
30.	*Hordeum vulgare*	Clapham (1973)
31.	*Hyoscyamus niger*	Corduan (1975); Raghavan (1975, 1976)
32.	*Hyoscyamus muticus*	Werniche et al., (1979)
33.	*Lilium longiflorum*	Sharp et al., (1980)
34.	*Loburia maritima*	Geel et al., (1981)
35.	*Lolium multiflorum*	Clapham (1971)
36.	*Lolium multiflorum x Festuca arundinacea*	Nitzche (1970)
37.	*Lolium perenne*	Clapham (1971)
38.	*Luffa cylindrica*	Sinha şi col. (1978)
39.	*Luffa echinata*	Sinha şi col. (1978)
40.	*Lycopersicum esculentum*	Gresshoff şi Doy (1972); Gulshan et al. (1981)
41.	*Nicotiana alata*	Nitsch (1969)
42.	*Nicotiana attenuata*	Nitsch (1969)

Scanned with OKEN Scanner

43.	*Nicotiana clevelandii*	Collins şi Sunderland (1974)
44.	*Nicotiana glauca x N. langsdorfii*	Vyskot şi Novak (1974)
45.	*Nicotiana glutinosa*	Smith (1974)
46.	*Nicotiana knightiana*	Nitsch (1969)
47.	*Nicotiana octophora*	Collins şi Sunderland (1974)
48.	*Nicotiana paniculata*	Collins et al. (1972)
49.	*Nicotiana raimondii*	Nakamura et al. (1974)
50.	*Nicotiana rustica*	Collins şi Sunderland (1974)
51.	*N. sandere (N. forgetina x N. alata)*	Nitsch şi Nitsch (1969)
52.	*Nicotiana suaveolens*	Vyskot şi Novak (1974)
53.	*N. suaveolens x N. langsdorfii*	Smith (1974)
54.	*Nicotiana sylvestris*	Guo (1972)
55.	*Nicotiana tabacum*	Bourgin şi Nitsch (1967)
56.	*N. glauca x N. tabacum*	Bourgin şi Nitsch (1967)
57.	*N. tabacum(4n=96)*	Niizeki şi Kita (1975)
58.	*N. tabacum(3n=72)*	Niizeki şi Kita (1975); Niizeki (1977)
59.	*N. tabacum(aneuploid)*	Niizeki şi Kita (1975)
60.	*N. velutina*	Vagera (1978)
61.	*Oryza perennis*	Oone (1975)
62.	*Oryza sativa*	Niizeki şi Oone (1968;1971); Guha et al., (1970)
63.	*Oryza sativa (hibrid)*	Sunderland (1975)
64.	*Paeonia hybrida*	Doreswamy şi Chacko (1973)
65.	*Petunia axillaris*	Doreswamy (1974); Raquin şi Pilet (1972)
66.	*Petunia hybrida x P. amyllaris*	Iyer şi Raina (1972); Wagner şi Hess (1974)
67.	*Petunia hybrida*	Sangwan şi Norelle (1975); Raicu şi Badea (1980)
68.	*Petunia parodii*	Mitchell et al. (1980); Martineau et al., (1981)
69.	*Physalis minime*	Gupta (1982)
70.	*Populus nigra*	George şi Rao (1979)
71.	*Populus simonii x P. nigra*	Wang et al. (1975)
72.	*Populus ussuriensis*	Anonimi (1975)
73.	*Saintpaulia ionantha*	Anonimi (1975)
74.	*Secale cereale*	Hughes et al. (1975)
75.	*Solanum melongena*	Wenzel şi Thomas (1974); Thomas şi Wenzel (1975)
76.	*Solanum nigrum*	Ham (1972)
77.	*Solanum suratense*	Sinha et al. (1979)
78.	*Solanum tuberosum (2x)*	Foroughi-Wehr et al. (1977); Sopory et al., (1978)

Scanned with OKEN Scanner

79.	*Triticale*	One şi Larter (1976); Wang et al., (1973); Sun et al., (1974)
80.	*Triticum aestivum (n=3x=21)*	De Buyser şi Henry (1980)
81.	*Triticum aestivum*	Ouyang et al. (1973); Wang et al. (1973); Picard et al. (1979)
82.	*Triticum aestivum x Agropyron glaucum*	Wang et al. (1975)
83.	*Triticum monococcum*	Tang şi Halloran (1982)
84.	*Vitis vinifera*	Gresshoff şi Doy (1974)
85.	*Vitis vinifera x V. rupestris*	Rajsekaran şi Mullins (1980)
86.	*Zea mays*	Ku et al. (1975); Nitsch et al. (1980)

Se consideră că formarea plantelor din polen este controlată de o interacţiune a genelor nucleare şi citoplasmatice, care poate fi influenţată de compoziţia mediului şi condiţiile de cultură.

b) Factori fiziologici

- *Starea fiziologică a plantei donor*

Sursa de antere ideală pentru cultura *in vitro* constă în plante mamă viguroase şi sănătoase. Regimul de umiditate în care sunt crescute aceste plante, ca şi condiţiile de lumină şi temperatură afecteză potenţialul embriogenetic al anterelor cultivate. Se recomandă utilizarea de plante mamă crescute în câmp sau fitotron pentru a fi evitate stările de stress de orice fel, iar cu 3-4 săptămâni înainte de recoltarea butonilor florali nu se recomandă folosirea pesticidelor.

- *Vârsta plantei donor*

Cercetările în domeniul androgenezei au evidenţiat o corelaţie pozitivă între vârsta plantei donor şi răspunsul anterelor în cultură. Potenţialul androgenetic este mai mare la începutul perioadei de înflorire şi scade pe măsură ce creşte vârsta plantelor, aspect observat la diferite specii dintre care citäm: *Datura metel, Nicotiana tabacum, Atropa belladonna, Petunia hybrida* (BADEA şi RAICU, 1984), *Brassica oleracea* (NICUŢĂ şi GHIORGHUŢĂ, 2003). DUNWELL (1985) a remarcat că poate fi stabilită o relaţie indirectă între anumiţi indici morfologici (diametrul florii, lungimea corolei etc) şi răspunsul androgenetic. O astfel de legătură există între dimensiunea petalelor şi numărul de plante regenerate din antere : la o alungire cu numai 2 mm a petalelor florilor de tutun s-a produs o reducere de 4 ori a numărului de plante regenerate din stamine. Efectul vârstei plantei donor asupra

Scanned with OKEN Scanner

potenţialului androgenetic trebuie studiat la fiecare specie şi varietate deoarece, de exemplu, la *Nicotiana tabacum* var. *Havanna* nu au fost observate diferenţe între primii şi ultimii muguri florali, (JOHANSSON şi ERIKSON, 1977).

- *Stadiul de dezvoltare a polenului*

Este un factor deosebit de important pentru reacţia lui androgenetică. De aceea iniţierea androgenezei la o specie trebuie precedată de observaţii (prin colorare Feulgen, de exemplu) asupra dezvoltării polenului din stadiul de tetradă, către stadiul binucleat. Cei doi nuclei se colorează diferit: cel vegetativ devine trandafiriu-pal, iar cel generativ se colorează în roşu închis.

Pentru aprecierea momentului optim de dezvoltare a microsporului în vederea inducerii androgenezei, a fost necesară standardizarea stadiilor pe baza examinării citologice directe a polenului. Stadiul optim de dezvoltare a microsporilor şi de recoltare a anterelor pentru inocularea pe medii nutritive se înscrie între stadiul de tetradă şi stadiul imediat următor primei mitoze polinice, până la apariţia grăunciorilor de amidon, (NITSCH, 1981).

Momentul în care microsporul îşi schimbă evoluţia normală gametofitică spre androgeneză este bine determinat, dar diferă de la o specie la alta şi chiar de la o varietate la alta în cadrul aceleiaşi specii. Deoarece identificarea citologică a stadiului de dezvoltare a polenului este anevoioasă, pentru cultivarea pe scară largă a anterelor s-a recurs la criterii indirecte, dintre care fac parte: dimensiunile butonului floral, dimensiunile şi culoarea anterelor, distanţa dintre ligula frunzei-steag şi frunza următoare etc.

- *Peretele anterei*

Referitor la rolul peretelui anterei în androgeneză, există două concepţii total opuse: unii cercetători îl consideră stimulator, alţii din contra, inhibitor. Pentru rolul stimulator pledează faptul că extractul apos de antere induce creşterea polenului izolat (NITSCH şi NORREL, 1973), iar frecvenţa embrioizilor creşte în culturile de polen din anterele precultivate. Conform opiniei altor autori, peretele anterei ar elibera unul sau mai mulţi factori inhibitori în timpul culturii.

- *Mediul de cultură*

Succesul în obţinerea embrioizilor androgenetici depinde în mare măsură şi de mediul folosit pentru cultura anterelor, indiferent dacă

Scanned with OKEN Scanner

acesta este lichid sau solid, (tabelul 4.6). Supraviețuirea embrionilor este condiționată atât de prezența unui amestec de săruri minerale, vitamine, regulatori de creștere, cât și de o sursă potrivită de carbon.

Tabelul 4.6. Medii nutritive pentru culturi de antere (după PRISECARU și GHIORGHIȚĂ, 2002)

Componente chimice (mg/l)	Cereale (CHU, 1978)	*Solanaceae* (Sunderland, 1979)	Specii de *Brassica* (Keller,1978)
KNO_3	2,83	950	2,5
NH_4NO_3	-	825	-
$(NH_4)_2SO_4$	463	-	134
$CaCl_2 2H_2O$	166	220	750
$MgSO_4\ 7H_2O$	185	185	250
KH_2PO_4	400	85	-
$NaH_2PO_4H_2O$	-	-	150
Sequestren Fe 330	-	-	40
$FeSO_4\ 7H_2O$	17,8	27,8	-
Na_2EDTA	37,3	37,3	-
$MnSO_4\ 4H_2O$	4,4	11,2	10
H_3BO_3	1,6	3,1	3,0
$ZnSO_4\ 7H_2O$	1,5	4,3	2,0
KI	0,8	0,4	0,8
$Na_2MoO_4\ 2H_2O$	-	0,13	0,25
$CuSO_4\ 5H_2O$	-	0,013 opționale	0,025
$CoCl_2\ 6H_2O$	-	0,013	0,025
Tiamină HCl	1,0	0,05	10
Piridoxină HCl	0,5	0,25	1,0
Ac nicotinic	0,5	0,25	1,0
Glicină	2,0	1,0	800
Glutamină	-	800 (pt. cult. polen)	
a - serină	-	100	-
m - inositol	-	5000	100
Zaharoză	90.000 - 120.000	20	100
Kinetină	0,5	-	-
2,4 -D	2,0	-	0,1
NAA	-	-	0,1

* Mediile se ajustează la pH = 5,8 înainte de autoclavare. Se adaugă 7-10 g/l agar și 3 – 10 g/l cărbune activ

Scanned with OKEN Scanner

Compoziţia în elemente minerale de bază nu pare să fie critică, deoarece androgeneza are loc pe mediile folosite în mod curent şi pentru cultura ţesuturilor somatice, doar zaharoza ar avea un rol important în inducţia androgenezei. Fitohormonii, bazele purinice şi pirimidinice, vitaminele nu influenţează sensibil această reacţie, (SUNDERLAND, 1971).

Suplimentarea mediului cu *zaharoză* pare a fi o cerinţă de bază în cultura de antere. Necesarul de zaharoză diferă în cazul diverselor specii de la 2-3 % în cazul *Solanaceaelor*, la 6% pentru grâu şi orez, până la 12% la secară, (NITSCH, 1981). Deşi zaharoza s-a dovedit cea mai bună sursă de carbon în experienţele de androgeneză, rezultate pozitive s-au obţinut la unele plante şi prin utilizarea glucozei, lactozei, dextrozei, galactozei.

Datorită conţinutului său ridicat în *substanţe de creştere* (mai ales auxine şi gibereline), polenul nu necesită întotdeauna adăugarea acestora în mediul de cultură. Prezenţa auxinelor şi citokininelor în mediul de cultură intensifică diviziunea celulelor şi determină evoluţia celulei polinice spre calusogeneză şi nu spre embriogeneză. Rezultate foarte bune în răspunsul embriogenic al anterelor s-au obţinut şi în cazul utilizării *extractelor naturale* de nucă de cocos, cartof şi chiar de antere, (GUHA şi MAHESHWARI, 1966).

Mediile nutritive lichide oferă condiţii mai bune în răspunsul androgenetic decât cele solidificate cu agar. Ele au însă dezavantajul că nu asigură flotabilitatea anterelor, astfel că acestea cad la fundul vasului şi se necrozează. Pentru depăşirea acestui neajuns s-a imaginat o soluţie de compromis - cultura pe medii cu două faze. Deasupra mediului agarizat se depune un strat subţire de mediu lichid, asfel încât anterele nu mai pot ajunge în condiţii submerse.

S-a constatat de asemenea că reducerea tensiunii oxigenului (la 2,5 - 5%) în vasul de cultură şi creşterea concentraţiei de CO_2 stimulează embriogeneza polinică. Prin această acţiune se reproduc într-o oarecare măsură condiţiile în care trăieşte polenul în anteră, ceea ce contribuie la creşterea viabilităţii lui.

c) Factori fizici

O serie de factori fizici pot acţiona în perioada dinaintea cultivării anterelor sau polenului pe mediile de cultură, cât şi în perioada de cultură. Anumite tratamente cu factori fizici, aplicate mugurilor florali sau anterelor înainte de cultivare, influenţează pozitiv dezvoltarea

Scanned with OKEN Scanner

plantelor din polen. Cel mai semnificativ este tratamentul ce constă în supunerea plantelor la temperaturi scăzute care, aplicat la mai multe specii, a stimulat răspunsul anterelor în cultură. Limitele acestei temperaturi şi durata de administrare variază în funcţie de specie. De exemplu, la *Solanaceae* şi grâu aceste limite sunt de 3 - 6°C timp de 3-15 zile, iar porumbul răspunde mai bine la temperatura de 14°C. Nu se cunoaşte exact rolul tratamentului la frig, dar se consideră că el ar schimba orientarea fusului de diviziune în timpul primei mitoze, favorizând formarea de microspori cu 2 nuclee, care ar fi mult mai embriogeni decât cei cu o celulă vegetativă şi una generativă. Se apreciază că temperatura scăzută întârzie procesele de senescenţă şi prelungeşte viabilitatea polenului.

Pe parcursul perioadei de cultivare se consideră că *temperatura* optimă pentru inducerea embrioizilor variază între 25-30°C. Există specii la care răspunsul androgenetic a fost mai puternic prin expunerea vaselor de cultură inoculate cu antere, timp de câteva zile, la o temperatură mai ridicată (30-35°C), urmată de plasarea acestora în condiţii de temperatură obişnuită (25°C).

Şi *lumina* este un factor important pentru răspunsul anterelor în cultură. Evoluţia androgenetică reclamă lumină de intensitate slabă, sau chiar întunericul. Rezultate bune s-au obţinut şi în cazul folosirii luminii albastre sau roşii. Dacă lumina albă de intensitate ridicată (5000 lx) inhibă androgeneza, lumina roşie a crescut randamentul de formare a plăntuţelor din polen şi a scurtat timpul necesar obţinerii acestora, (NITSCH, 1981).

Au fost incriminaţi şi alţi factori care pot afecta răspunsul androgenetic:

- poziţia anterelor pe mediul solid, (SOPORY şi MAHESHWARI, 1976);
- densitatea anterelor inoculate/vas de cultură, (FOULETIER, 1967);
- forma şi volumul vasului de cultură, (WANG, 1971);
- atmosfera din vasul de cultură, (DUNWELL, 1980).

Sub acţiunea factorilor amintiţi mecanismul inducţiei androgenetice este complex, iar procentul de polen care urmează calea androgenetică *in vitro* este în general redus. Rezultatele cercetărilor de acest gen au evidenţiat patru moduri de dezvoltare (evoluţie) androgenetică:

Scanned with OKEN Scanner

- *din celula vegetativă.* Diviziunile celulei vegetative duc la formarea de embriozi globulari ;
- *din celula generativă.* Embrioizii se formează prin diviziunea celulei generative.
- *din celulele vegetativă şi generativă.* La *Datura innoxia,* de exemplu, embrioizii (2n, 3n, 4n) se formează prin fuziunea nucleilor din celula vegetativă şi generativă în diferite etape ale replicării ADN;

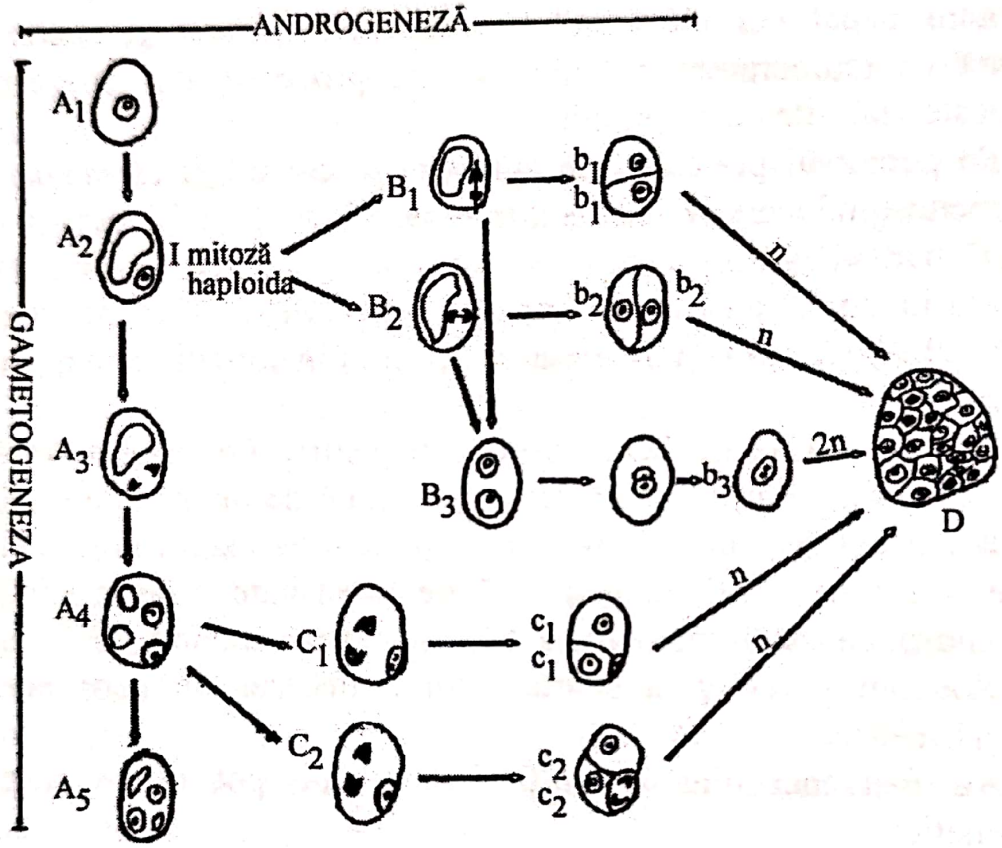


Fig. 4.11. Posibilităţi de inducere a androgenezei la *Datura innoxia* (după SANGWAN şi SANGWAN - NORREEL, 1978)

A_1 - A_5 - Stadiile de dezvoltare ale polenului normal; A_1- microspor uninucleat (nucleu central); A_2 - microspor cu nucleul periferic; B_1 - I mitoză haploidă cu axă modificată (paralelă); B_2 - I mitoză haploidă cu axa modificată (perpendiculară); b_1, b_2 - celule egale (n cromosomi) rezultate din I mitoză haploidă; B_3 -celule rezultate din I mitoză haploidă, la care nu apare membrana separatoare a celor 2 nuclei; b_3 - celulă cu 2n cromosomi, rezultată în urma suprapunerii şi fuzionării nucleilor; A_4 -grăuncior de polen în stadiul binucleat; C_1 - celulă vegetativă intrată separat în diviziune; C_2 - nucleu vegetativ şi generativ intraţi în diviziune; c_1- c_2 - celule egale rezultate din aceste diviziuni (n cromosomi).

Scanned with OKEN Scanner

- *din microspor*. În cea mai comună cale a androgenezei, mitoza microsporului duce la formarea a două celule egale şi identice, caracteristicile de colorare fiind asemănătoare celulei vegetative. În acest caz, embrioizii sau calusul se formează prin diviziunea continuă a celor 2 celule identice.

În figura 4.11 redăm posibilităţile de inducere a androgenezei la *Datura innoxia*.

Căile androgenezei diferă nu numai de la o specie la alta, ci chiar şi la aceeaşi anteră. În general, predomină una din căile menţionate anterior. Procesele de diviziune celulară şi dezvoltare ulterioară sunt similare cu ceea ce se petrece în cazul embriogenezei zigotice sau somatice. Înainte de a forma o plantă completă, embrioizii multicelulari parcurg stadiile: "globular", "inimă", "torpedo" şi "cotiledonar" (fig. 4.12).

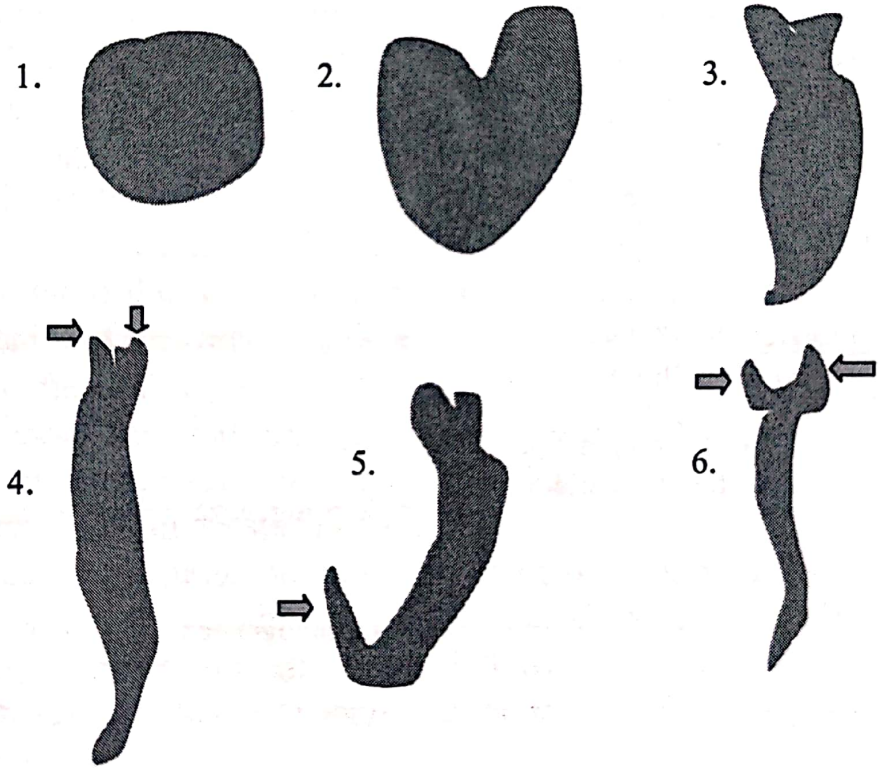


Fig. 4.12. Reprezentarea schematică a stadiilor de formare a embrionilor şi plantelor din polen la *Hyoscyamus niger* (după RAGHAVAN şi NAGMANI, 1989):

1. Embrioid globular (12 zile de cultură); 2. Embrioid cordiform (15 zile de cultură); 3. Embrioid "torpedo" (18 zile de cultură); 4. Embrioid în stadiul cotiledonar (20 zile de cultură); 5. Elongaţia primordiului radicular al embrionului (22 zile de cultură); 6. Stadiu mai avansat al transformării embrionului într-o plantulă cu cotiledoane extinse şi rădăcină alungită (22 zile de cultură).

Scanned with OKEN Scanner

Polenul nu urmează în fiecare situație calea embriogenezei normale, ci se divide anarhic şi formează un calus care străpunge paretele anterei. Acest tip de dezvoltare este întâlnit la unele specii ca: *Hordeum, Asparagus, Coffea* etc, (RAGHAVAN, 1980). S-a constatat că prezența auxinei în mediul de cultură împiedică organizarea celulelor în embrioni; efectul 2,4-D s-a tradus prin ruperea prematură a exinei şi dezvoltarea calusului alcătuit din celule parenchimatice nediferențiate. Transferarea pe medii mai simple sau suplimentate cu citokinine are ca rezultat declanşarea organogenezei şi formarea lăstarilor şi/sau a rădăcinilor. Uneori s-a semnalat şi fenomenul de embriogeneză secundară la nivelul celulelor calusului, fenomen frecvent întâlnit la *Solanaceae.*

O schemă a căilor directe şi indirecte ale androgenezei la *Datura innoxia* este prezentată în figura 4.13.

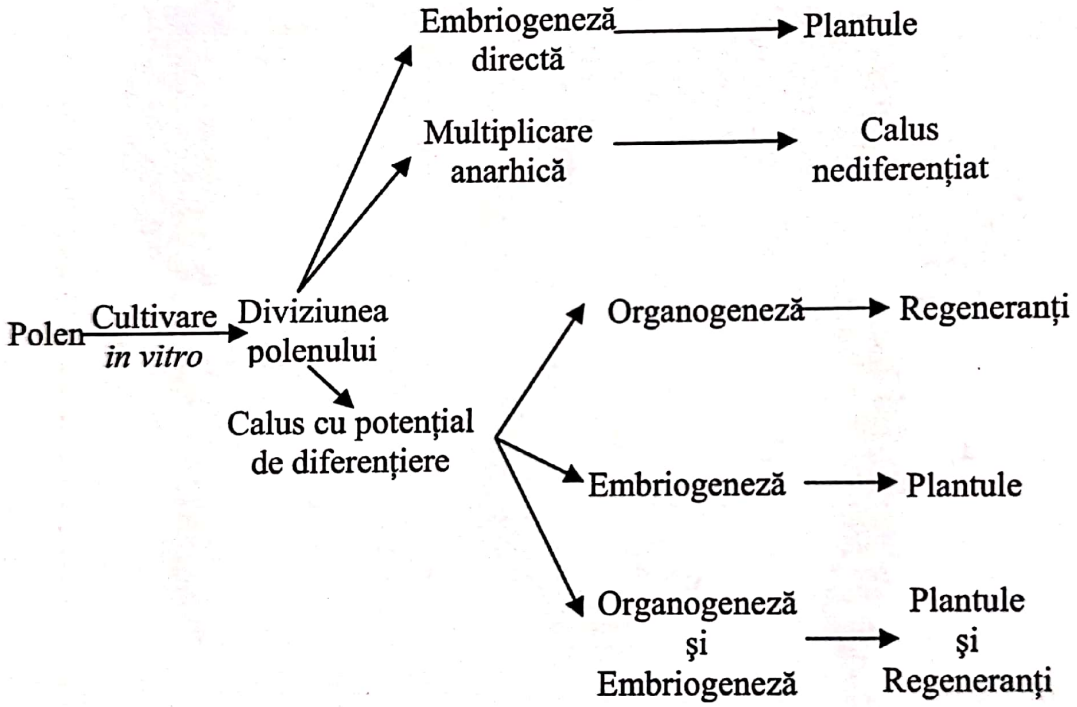


Fig. 4.13. Reprezentarea schematică a căilor directe şi indirecte ale androgenezei la *Datura innoxia,* (după SANGWAN şi SANGWAN - NORREEL, 1987)

B. *Nivelul de ploidie a plantelor derivate din polen*

Obținerea de plante din polen s-a dovedit o sursă importantă de variabilitate. Numărul de plante haploide obținute prin androgeneză experimentală în culturi *in vitro* este foarte mic, fapt datorat unor factori

Scanned with OKEN Scanner

ca: influenţa negativă a inhibitorilor de creştere prezenţi în peretele anterei, generarea de calus din microspori (care din cauza stării haploide a celulelor prezintă perturbări ale diviziunii urmată de eliminarea acestora), generarea calusului din peretele anterei şi nu din microspori etc. De aceea se consideră că pentru obţinerea de haploizi din polen este de preferat cultura microsporilor, deşi s-a dovedit eficientă la un număr redus de specii.

Cultura *in vitro* de antere sau polen duce la obţinerea de plante cu grade diferite de ploidie: n, 2n, 3n, 4n etc. Există şi sub acest aspect diferenţe în funcţie de specia testată. Aşa de exemplu, la tutun, majoritatea indivizilor obţinuţi erau haploizi; în cazul laurului păros numărul indivizilor haploizi era redus, majoritatea fiind diploizi, iar în cazul altor specii indivizii au fost predominant diploizi. În culturi de antere la *Datura innoxia* au fost obţinute plante al căror grad de ploidie se înscrie în intervalul n - 6n (BADEA şi RAICU, 1983), la *Oryza sativa* între n - 5n (NISHI şi MITSUOKA, 1975), iar la *Hordeum vulgare* între n - 4n (CLAPHAM, 1980). La *Brassica napu,* RENART şi DOSBA, 1981 au obţinut pe lângă plante n, 2n, 3n şi aneuploizi.

Variabilitatea indivizilor regeneraţi prin androgeneză ar fi datorată în special factorilor de natură genetică, originii lor diferite (fie din celulele uninucleate rezultate din mitozele modificate, fie din celula generativă, fie din cea vegetativă). Conţinutul de ADN, ca şi evoluţia nucleilor (egali) rezultaţi din mitoza modificată a nucleului generativ şi vegetativ (pe parcursul maturării polenului) sunt diferite, de aceea şi plantele rezultate din aceştia sunt diferite.

În cazul plantelor obţinute din calusul organogen sau embriogen de natură polinică, variabilitatea este dată şi de efectul condiţiilor de cultură, a componenţilor din mediul nutritiv, a perturbărilor genetice celulare ce se produc pe parcursul subcultivărilor repetate până la obţinerea regeneranţilor.

Nu sunt puţine condiţiile care trebuie îndeplinite pentru regenerarea de plante din microspori, de aceea randamentul culturii de antere (numărul de plante haploide induse per total microspori cultivaţi) este foarte scăzut.

În cadrul fiecărei specii, genotipurile au răspunsuri caracteristice, ceea ce dovedeşte controlul strict genetic al diviziunii microsporilor şi diferenţierii ulterioare a embrionilor sau calusului. La *Beta vulgaris*, de

Scanned with OKEN Scanner

exemplu, din 16 clone analizate numai trei au reacţionat pozitiv, prima condiţie pentru obţinerea de rezultate reproductibile la o anumită specie fiind deci depistarea clonelor cu capacitate androgenetică.

4.1.6.2. Ginogeneza experimentală

Termenul de *ginogeneză* a fost introdus de WILSON în 1952 şi semnifică procesul de transformare într-un embrion a unei oosfere nefecundate, sau a unei celule ou, din care sunt expulzaţi cromozomii de origine paternă, după fecundare. Plantele obţinute prin ginogeneză se mai numesc şi plante „fără tată", ele conţinând doar setul de cromosomi materni, (ONISEI şi GHIORGHIŢĂ , 1990).

În condiţii experimentale, ginogeneza se realizează prin cultura *in vitro* a gametofitului femel. Pentru inducerea acestui fenomen se recomandă plecarea de la ovule, numai că acestea sunt adeseori greu de izolat. De aceea, în practică se utilizează mai mult cultura de ovare, (WENZEL et al., 1992; BOHANEC et. al., 1994; PICARD et al., 1994).

Primele plante haploide de origine ginogenetică au fost obţinute în anul 1976 la orz (*Hordeum vulgare*) prin cultura *in vitro* de ovare de către SAN NOEUM. Trei ani mai târziu, ZHU şi WU au regenerat haploizi în culturi de ovare prelevate de la grâu şi tutun. În anul 1980, ASSELIN de BEAUVILLE în Franţa şi ZHOU şi YANG în China, au comunicat obţinerea unor haploizi ginogenetici la orez. Lista speciilor la care încercările de ginogeneză experimentală s-au materializat în tot atâtea succese, a continuat să crească, (tabelul 4.7).

Tabelul 4.7. Specii la care au fost obţinute plante prin ginogeneză (după PRISECARU şi GHIORGHIŢĂ , 2002)

Specia	Referinţe bibliografice	Plante regenerate
Hordeum vulgare	San (1976); Wang şi Kuang (1981)	n verzi
Triticum aestivum	Zhu şi Wu (1979); Zhu şi al., (1981); Prisecaru şi Ghiorghiţă (1998) Zhang et al., (1993)	n verzi
Oryza sativa	Asselin de Beauville (1980); Zhou şi Yang (1980); Kuo (1982)	n mixoploide n, 2n verzi şi unele albinotice
Zea mays	Ao şi al., (1982); Truong-Andre şi Demarly (1984)	n, 2n verzi
Nicotiana tabacum	Zhu şi Wu (1979); Ran (1980); Wu şi Chen (1982)	n verzi

Scanned with OKEN Scanner

Beta vulgaris	Hosemans şi Bossoutrout (1983); Znamenskaya et al., (1994); Mezei şi Kovacev, (1994); Prisecaru şi Ghiorghiţă (1996)	n verzi
Jerbera jamesonii	Sitben (1981); Meynet şi Sibi (1984)	n, 2n verzi n verzi
Lactuca sativa	San (1987)	n, 2n verzi
Helianthus annuus	Gelebart (1987); Prisecaru şi Ghiorghiţă (1998)	n, 2n verzi
Cucurbita pepo	Chambonnet şi Dumas (1985)	2n, mixoploide Poliploide verzi
Populus sp.	Wu şi Xu (1984)	2n, mixoploide Poliploide verzi n verzi
Picea abies	Huhtinen şi al., (1981)	n verzi
Ephedra foliata	Sing şi al., (1981)	n verzi
Helianthus tuberosus	Zhu şi al., (1982)	n, aneuploide verzi
Helianthus annuus	Zhu şi al., (1982)	n, aneuploide verzi
Orientalis lilies	Prakash şi Giles (1985)	2n verzi
Solanum tuberosum	Prisecaru şi Ghiorghiţă (1998)	n, 2n, aneuploide verzi

Ca şi în cazul androgenezei experimentale, obţinerea haploizilor prin cultivarea *in vitro* a gametofitului femel, este dictată de interacţiunea unui număr mare de factori.

A. *Factori care influenţează ginogeneza experimentală*

a) Factori genetici

Genotipul plantei donor influenţează puternic succesul culturii de ovare. De exemplu, din 19 genotipuri de orez, 15 varietăţi de "*japonica*" au generat calus ginogenetic cu o frecvenţă de 5 - 12 %, iar din 4 varietăţi de "*indica*", doar 2 au răspuns ginogenetic cu o frecvenţă de 1,1 - 2,8 %, (ZHOU et al., 1983). În general varietatea "*indica*" este mai recalcitrantă decât "*japonica*", aspect observat şi în cazul culturii de antere. Genotipul fiecărei specii, varietate sau chiar individ dictează potenţialul androgenetic şi ginogenetic al plantelor. O specie care exprimă o frecvenţă mare de regenerare în culturi de antere, poate prezenta un răspuns scăzut în cultura de ovare, sau invers, o specie cu randament ridicat de regenerare în culturi de ovare/ovule, poate avea o eficienţă scăzută în cultura de antere/microspori.

Scanned with OKEN Scanner

b) Factori fiziologici

- *Stadiul de dezvoltare a sacului embrionar*

Stadiul optim de inoculare a ovulelor pe medii aseptice este influenţat de momentul când sacul embrionar devine matur. Astfel, între stadiul de sac embrionar uninucleat şi stadiul de patru nuclei înainte de fecundare, este asigurată obţinerea de plante haploide prin ginogeneză. Maturarea sacului embrionar determină scăderea frecvenţei de regenerare a plantelor.

În scopul aprecierii momentului propice pentru inoculare, se folosesc o serie de metode: efectuarea de preparate microscopice – secţiuni în parafină (tehnică destul de laborioasă), folosirea de indicatori morfologici (indirecţi) cum ar fi: culoarea anterelor (la cereale), poziţia ovulului în ovar (la gerbera), poziţia stilului faţă de antere (la salată şi floarea-soarelui), forma şi dimensiunile ovulului (la sfeclă), forma ovarului şi apariţia mătăsii (la porumb) etc, (RAICU şi BADEA, 1990).

- *Compoziţia mediului de cultură* are un rol decisiv în procesul de ginogeneză.

Mediile de cultură folosite sunt cele derivate din reţetele clasice de bază. La acestea se adaugă o anumită balanţă fitohormonală, asociată cu un aport vitaminic corespunzător, în funcţie de natura ţesutului cultivat. În general, ovulele au nevoie de un aport vitaminic şi hormonal ridicat, comparativ cu ovarele, aceasta probabil pentru a suplini dezechilibrul cauzat de lipsa învelişului ovarian şi absenţa efectului stimulator asupra creşterii ţesutului placentar.

Concentraţia zaharozei, ca şi prezenţa mio-inositolului, pot influenţa sensibil procesul ginogenetic inductiv. De exemplu, o cantitate crescută de zaharoză (6-10%) în absenţa mio-inositolului, nu este favorabilă inducţiei ginogenetice la sfecla de zahăr, grâu şi floarea soarelui. În acelaşi timp, alături de mio-inositol, grâul şi floarea –soarelui necesită o cantitate crescută de zaharoză (8-10%) pentru menţinerea viabilităţii ovarului şi evoluţia spre calus ginogenetic, (PRISECARU, 1997).

Pentru o difuzie cât mai bună a substanţelor nutritive din mediul de cultură, se recomandă inocularea ovarelor în poziţie verticală, poziţie identică celei „naturale" a ovarului în floare şi a ovulului în ovar.

Scanned with OKEN Scanner

c)Factori fizici

Succesul în obţinerea embrioizilor ginogenetici depinde în mare măsură şi de condiţiile de cultivare *in vitro*, în special de lumină (fotoperioadă) şi temperatură.

Experienţele efectuate la diferite specii de plante au demonstrat că pentru inducerea ginogenezei nu este absolut necesar tratamentul termic al butonilor florali. Astfel, menţinerea la cald (12-14°C) sau la rece (4°C) a plantelor de orez, grâu, sfeclă de zahăr, floarea-soarelui şi cartof, pentru 3,7,10 zile, nu a dus decât la deprecierea mugurilor florali şi deci a ovarelor şi ovulelor, (ZHOU şi YANG, 1980, 1981; PRISECARU, 1997).

La majoritatea speciilor, culturile de ovare/ovule sunt incubate la lumină: fotoperioada 12-16 ore, iar intensitatea luminoasă poate varia, de exemplu între 500 lx (gerbera) şi 3000 1x (grâu, orz, sfeclă de zahăr). La alte specii, cum ar fi floarea soarelui, rezultate mai bune s-au obţinut dacă incubarea s-a realizat la întuneric. În funcţie de specie, perioada de inducţie ginogenetică durează între 4 şi 8 săptămâni.

Şi temperatura de incubaţie variază de la specie la specie, de la 23°C (la gerbera, varză, conopidă), la 30°C (la floarea soarelui, porumb).

B. *Ontogenia embrioizilor ginogenetici*

Cercetările embriologice realizate în scopul evidenţierii originii plantelor haploide au demonstrat că ea are la bază diviziunea unora din componentele sacului embrionar:

a) *Diviziunea sinergidelor*

În urma experimentelor şi a observaţiilor microscopice s-a concluzionat că embrioizii sau calusurile se pot dezvolta din sinergide. De exemplu, la orez proembrionul ginogenetic apare frecvent situat în dreptul micropilului, derivând dintr-o sinergidă. La câteva zile după inocularea ovarelor are loc prima diviziune a sinergidelor, urmată de alte diviziuni ce formează în final proembrionul multicelular.

b) *Diviziunea oosferei*

Majoritatea embrionilor ginogenetici derivă din oosferă, celulă care parcurge aceleaşi stadii de dezvoltare ca şi zigotul. Germinarea embrionului şi formarea plantulei se desfăşoară diferit în funcţie de specie. Astfel, la sfecla de zahăr, grâu şi orz aceste procese au loc în interiorul ovarului pe mediul de inducere, la circa 2 luni de la inoculare; la floarea soarelui embrionii trebuie scoşi din ovule şi subcultivaţi pe alte

Scanned with OKEN Scanner

medii de regenerare, (PRISECARU şi GHIORGHIŢĂ, 2002). Unele formaţiuni proembrionare evoluează spre calus ginogenetic, la nivelul căruia se pot dezvolta secundar embrioni normali şi plante ginogenetice.

c) *Diviziunea antipodelor*

Antipodele formează o structură globulară, multicelulară ca şi *in vivo*. Întâmplător ele pot să producă structuri de tipul calusului şi proembrionilor (orz, floarea soarelui). Se pare totuşi că această cale nu ocupă un loc semnificativ în ginogeneză.

d) Diviziunea nucleilor polari

Diviziunea nucleilor polari nefertilizaţi a fost observată în cultura de ovule la bumbac (JENSEN et al., 1977), în cultura *in vitro* a ovarelor la orez (ZHOU şi YONG, 1983) şi la orz (HUANG et al., 1987). Structura formată este asemănătoare endospermului *in vivo* în stadiul timpuriu. Aceasta însă nu prezintă rol de ţesut nutritiv pentru embrionul ginogenetic şi nici nu se poate dezvolta într-o plantă, (PRISECARU şi GHIORGHIŢĂ, 2002).

Studiile histologice efectuate pe ovare nefertilizate, cultivate *in vitro* la diferite specii de plante au evidenţiat că embrioizii pot avea o evoluţie directă spre embrion şi plantă, parcurgând stadiile cunoscute *in vivo* (globular, cordiform, torpedo, cotiledonar) sau pot evolua spre calus, în funcţie de genotip sau de compoziţia în fitohormoni a mediului de cultură, (RAICU, 1990).

C. *Starea citogenetică a plantelor regenerate în culturile de ovare şi ovule*

În general, în populaţiile ginogenetice există un număr mai mare de plante haploide (%) şi un număr mai mic de plante diploide comparativ cu populaţiile androgenetice. Alături de acestea se obţin şi plante cu grade diferite de ploidie. Studii citogenetice efectuate, de exemplu, în calusul de origine ginogenetică la grâu şi cartof au evidenţiat prezenţa atât a celulelor haploide cât şi a celor diploide, iar în cazul cartofului a multor celule aneuploide. S-a evidenţiat de asemenea prezenţa unor nuclei endoreduplicaţi în diviziune.

Observaţiile citogenetice efectuate pe meristemele radiculare ale plantelor obţinute, recoltate la prima repicare, a dovedit o frecvenţă ridicată de inducere a gametofitului femel în plante haploide la grâu, cartof şi sfeclă de zahăr.

Scanned with OKEN Scanner

Identificarea la diverse specii de plante a mixoploizilor, aneuploizilor şi a plantelor 4n, alături de plante n şi 2n, precum şi a nucleilor endoreduplicaţi, demonstrează instabilitatea genomului haploid în condiţiile cultivării *in vitro* şi tendinţa lui de diploidizare spontană.

4.1.6.3. Importanţa teoretică şi practică a haploidiei experimentale

Pe plan mondial, până în prezent s-au obţinut haploizi prin andro- şi ginogeneză experimentală, la peste 250 specii de mono-, dicotiledonate şi unele gimnosperme.

Studiile citogenetice efectuate pe haploizi au contribuit la descifrarea unora din mecanismele genetice care au stat la baza evoluţiei speciilor. Ele au confirmat originea autopoliploidă a unor specii şi originea alopoliploidă a altora.

Datorită stării de hemizigoţie a haploizilor (monoploizilor), caracteristică ce permite manifestarea tuturor genelor prezente în genotip, pot fi identificate, pe baza analizei genetice, genele alele normale cât şi genele alele mutant, apărute spontan sau prin inducerea cu ajutorul factorilor mutageni.

Haploizii pot fi utilizaţi cu succes pentru:

- studiul proceselor de control genetic al diviziunilor celulare;
- depistarea rearanjărilor structurale ale cromosomilor (a dislocaţiilor);
- identificarea genelor şi funcţiilor lor;
- stabilirea grupelor de linkage;
- întocmirea hărţilor genetice etc.

Metoda haploidiei este utilizată în ameliorare, ea oferind noi perspective activităţii de creare a unor noi genotipuri. Haploizii posedă două atribute de interes major pentru amelioratori:

a) scurtează timpul necesar pentru obţinerea liniilor pure, homozigote;
b) reduc dificultatea identificării şi manipulării caracterelor urmărite, deoarece încă din primele faze ale selecţiei pot fi eliminaţi indivizii necorespunzători, toate genele nefavorabile manifestându-se fenotipic.

Haploidia (monoploidia) reprezintă o cale eficientă de obţinere a liniilor complet homozigote diploide (izogene) prin dublarea numărului

Scanned with OKEN Scanner

de cromosomi ai haploizilor, fiind astfel una din căile cele mai eficiente de obținere a liniilor consangvinizate. O importanță deosebită prezintă haploizii obținuți din organismele heterozigote, în special din hibrizii F_1 intra- şi interspecifici, deoarece prin diploidizarea haploizilor se fixează noile structuri apărute prin recombinare genetică, (REINERT şi BAJAJ, 1980).

La noi în țară primii haploizi şi linii izogene au fost obținute în perioada 1976 – 1980 în laboratorul de Genetică al Universității Bucureşti, la tutun, petunie şi laurul păros de un colectiv coordonat de profesorul PETRE RAICU. De exemplu, la tutun s-au obținut, plante haploide la trei soiuri (*Virginia RP 1349*, *Havan* şi *Wisconsin 38*) şi la 28 de hibrizi intra- şi interspecifici din cadrul genului *Nicotiana*. Ulterior acelaşi colectiv de cercetare a abordat metoda haploidiei prin andro- şi ginogeneză experimentală şi la specii de interes economic: triticale, floarea soarelui, vița de vie, lucernă etc.

4.1.7. Variabilitatea somaclonală şi importanța ei practică

Variabilitatea genetică care însoțeşte culturile *in vitro* la plante a fost denumită la început *fenovariație* sau *vitrovariație* (SIBI, 1971), dar termenul care s-a impus în cele din urmă a fost cel de *variație somaclonală* (LARKIN şi SCOWCROFT, 1981). Culturile *in vitro* la plante pot fi folosite atât la păstrarea calităților valoroase ale unui genotip şi clonarea acestuia, cât şi la inducerea variabilității genetice. În primul caz se apelează la cultura de meristeme (vârfuri de lăstari, apexuri), iar în cel de al 2-lea caz la organogeneza indirectă *via calus*, cultura de organe, de protoplaşti etc.

4.1.7.1. Cauzele variabilității somaclonale

Dacă la plantele intacte există un control strict al secvenței ADN-mitoză, stabilitatea genomului fiind bine controlată în cazul meristemelor *in vivo* (D'AMATO, 1986; NUTI RONCHI et al., 1986), în condițiile cultivării *in vitro* acest mecanism de control fie este suspendat, fie funcționează defectuos - producându-se schimbări numeric şi structural cromosomiale. Unele explicații care se aduc procesului apelează chiar la perturbări produse sistemelor genetice extracromosomiale, sau la faptul că în culturile *in vitro* pot fi influențate nivelele de recombinare, sugerându-se prezența unui fenomen de amplificare genică, (SIBI, 1990);

Scanned with OKEN Scanner

s-ar putea de asemenea produce schimbări ale controlului crossing-overului, sau ale nivelului de metilare a ADN, (NUTI RONCHI, 1990).

Însăşi metoda de practicare a culturilor *in vitro* poate fi sursa unor variaţii genetice (definită ca o creştere a variabilităţii, ca răspuns la stressul provocat de cultura *in vitro*) - fără intervenţia cu agenţi mutageni. Factorii care determină apariţia variaţiilor somaclonale nu sunt încă bine cunoscuţi, dar frecvenţa acestor variaţii are legătură cu unele aspecte ca: specia în cauză, genotipul din care provine explantul, compoziţia mediului de cultură, durata subcultivării, vârsta culturii, condiţiile fizice din camerele de cultură etc.

Sintetizând observaţiile diverşilor autori care au studiat variaţiile cromosomilor în culturile *in vitro* la plante şi cauzele acestora, LEE şi PHILLIPS (1988) au concluzionat:

- unele variaţii preexistă în explant, mai ales în cazul speciilor polisomatice. Cu alte cuvinte, această variabilitate există deja în genotipul plantelor donor, iar prin cultura *in vitro* ea doar devine manifestă;
- tipul de explant utilizat în cultură poate fi o sursă importantă de variaţii cromosomiale. Anumite explante pot genera o variabilitate mai pronunţată comparativ cu alte explante de pe aceeaşi plantă;
- un anumit rol (uneori determinant) în variaţia cromosomală etalată în culturile *in vitro* poate să-l aibă genotipul explantului;
- starea citologică a celulelor cultivate depinde de regimul de cultivare (intervalul de subcultivare, condiţiile fizice ale mediului, compoziţia mediului de cultură - în special în regulatori de creştere etc);
- variaţia cromosomială tinde să crească odată cu durata menţinerii în cultura *in vitro*;
- între capacitatea de regenerare a celulelor cultivate şi stabilitatea cromosomială există o corelaţie pozitivă;
- cultura dezorganizată de calus este mai frecvent asociată cu instabilitatea cromosomilor faţă de culturile organizate, derivate din meristeme;
- în cultura *in vitro* se pot activa unele elemente transpozabile.

Se apreciază de asemenea că în culturile *in vitro* pot avea loc o serie de fenomene ca: deficitul unor elemente chimice, anoxia sau

Scanned with OKEN Scanner

disponibilitatea redusă a oxigenului, acţiunea mutagenă a unor produşi proprii de metabolism pe fondul unui prag de reacţie celulară mai redus etc, (D'AMATO, 1986).

4.1.7.3. Tehnici practicate în obţinerea variaţiilor somaclonale în culturile *in vitro* la plante

Tehnicile utilizate pentru generarea de variaţii somaclonale în cultura *in vitro* la plante sunt diverse. S-a constatat că prin regenerarea de plante din cultura îndelungată a unor ţesuturi, rezultă o mare variabilitate genetică, care include adesea schimbări numerice şi structurale ale cromosomilor. McCOY (1980) a demonstrat că prin cultura de ţesuturi la soiurile *Lodi* şi *Tippecanoe* de ovăz are loc o creştere substanţială în timp a frecvenţei plantelor cu anomalii citogenetice. La *Datura innoxia* rezultatele analizei citogenetice la care au fost supuse plantele regenerate *in vitro* în pasaje diferite, au arătat că pe măsură ce creşte vârsta culturilor, creşte şi numărul de plante poliploide regenerate, (BADEA şi RAICU , 1983), (tabelul 4.8).

Tabelul 4.8. Numărul de cromosomi la plante regenerate în culturi *in vitro* de diferite vârste

Nr. cromosomi ai plantelor donor	Nr. pasaje	Nr. plante analizate	Nr. plante cu grade variate de ploidie			
			n	2n	4n	8n
12 (n)	2	46	2	36	8	-
12 (n)	12	10	-	-	10	-
24 (2n)	2	56	-	17	39	-
24 (2n)	10	10	-	-	10	-
24 (2n)	20	5	-	-	4	1
48 (4n)	2	20	-	-	20	-
48 (4n)	10	10	-	-	10	-

O modalitate importantă de obţinere a variaţiilor somaclonale este regenerarea de plante din culturi de calus. Regenerarea de plante via calus măreşte considerabil frecvenţa somaclonelor. Cercetările lui OONO (1978, 1981) la orez au demonstrat o mare variabilitate fenotipică a plantelor regenerate din calusuri, caracterele urmărite fiind: cloroplaste, data înfloririi, înălţimea plantei, fertiliatea şi morfologia lor. La cele 800 de somaclone studiate, numai 28,1% din plante au prezentat fenotipul

Scanned with OKEN Scanner

normal (parental). Tot la orez, FUKUI (1983) a regenerat din calus 12 plante, din care 4 reprezentau fenovariaţii diferite (înspicare timpurie, albino, pai scurt, sterilitate), apărute independent în timpul creşterii calusului. Se demonstrează prin urmare, că în cultura celulelor nediferenţiate de calus poate avea loc o evoluţie genotipică rapidă, calusul constituind astfel o sursă importantă de variaţii somaclonale.

La *Datura innoxia* BADEA şi TESIO (1983) au obţinut regeneranţi diploizi, proveniţi din culturi iniţiate din organe vegetative de la un haploid. Deşi analiza citologică a evidenţiat că toate plantele regenerate au fost diploide (2n=24), studiul biochimic a evidenţiat existenţa unor mari variaţii în ceea ce priveşte conţinutul total în alcaloizi şi scopolamină, precum şi raportul scopolamină/alcaloizi totali. De exemplu, totalul alcaloidic a variat de la cantităţi neglijabile - la 0,28%, conţinutul în scopolamină de la cantităţi infime – la 0,173%, valoarea raportului scopolamină/total alcaloizi oscilând între 20 şi 74%, (BADEA şi RAICU, 1984).

Regenerarea de plante în culturi de protoplaşti oferă de asemenea posibilitatea obţinerii de variaţii somaclonale. Plantele regenerate din protoplaste prezintă frecvent variaţii somaclonale ce afectează unele caractere morfologice, fiziologice şi biochimice ale plantelor, care pot fi utilizate în programele de ameliorare. De exemplu, SHEPARD et al. (1980) au analizat peste 10.000 de plante regenerate din protoplaşti de *cartof* şi au identificat numeroase variaţii somaclonale care prezentau cel puţin o caracteristică diferită faţă de soiul de origine *Russet Burbank*, (unul dintre cele mai cultivate în America). Printre cele 65 somaclone selecţionate, unele erau rezistente la *Phytophtora infestans* (boală la care soiul de origine este sensibil), precum şi la *Alternaria solani*. Rezultate similare s-au obţinut la cartof şi în cazul soiului *Maris Bard*, (THOMAS, 1981).

O altă cale de inducere a variaţiilor somaclonale este cultura *in vitro* a unui anumit tip de ţesut. Cercetări efectuate la numeroase specii de plante au demonstrat că variaţii somaclonale pot apărea prin cultura oricărui tip de ţesut, însă frecvenţa lor este extrem de variată. De aceea este necesară alegerea cu grijă a tipului de explant. Van HARTEN şi BROERTJES (1981) au studiat la *Solanum tuberosum* posibilitatea măririi frecvenţei variaţiilor somaclonale prin utilizarea explantelor de origini diferite şi au constatat că în cazul explantelor de frunze, variaţiile

Scanned with OKEN Scanner

somaclonale ce afectează fenotipul plantelor regenerate reprezintă 12,3%, în timp ce explantele din rahis şi peţiol produc calusuri din care se regenerează plante cu o frecvenţă de 50,3% a variaţiilor somaclonale.

Frecvenţa somaclonelor depinde în mare măsură de genotipul plantei donatoare de explant. Studiind peste 4.600 plante regenerate din explante provenite de la 8 soiuri de trestie de zahăr, LIU şi CHEN (1976) au observat o frecvenţă foarte diferită a variaţiilor somaclonale, în funcţie de genotip. Astfel, la plantele regenerate din soiul F-156 frecvenţa variaţiilor a fost de 34,0 %, în timp ce la soiul F- 146 s-au obţinut numai 1,8% variaţii somaclonale.

Natura genetică a plantelor sursă de explante pare să influenţeze sensibil fenomenul de variaţie somaclonală. În acest sens, utilizarea hibrizilor interspecifici ca sursă de explante măreşte substanţial frecvenţa variaţiilor somaclonale şi dă posibilitatea obţinerii de genotipuri noi, realizate prin transfer de gene. Astfel, KASPERBAUER et al. (1979) au izolat peste 1.200 somaclone, provenite din plante regenerate din explante de la hibridul *Lilium multiflorum x Festuca arundinaceea* (F_1). S-a constatat că prin cultura îndelungată *in vitro* (peste 40 săptămâni), se obţin numeroase variaţii somaclonale la care se observă atât modificări fenotipice cât şi cariotipice.

În mod similar, AHLOOWALIA (1976-1978), a cultivat embrioni triploizi ai hibridului interspecific *Lolium perenne* (2n) x *Lolium multiflorum* (4n), iar din calusurile obţinute a regenerat peste 200 de plante timp de 5 ani. Dintre acestea au fost izolate numeroase variaţii somaclonale ce prezentau modificări fenotipice care afectau forma şi mărimea frunzelor, morfologia florală, vitalitatea şi ciclul de viaţă a plantelor. La unele dintre aceste somaclone s-au obsevat modificări cariotipice, atât în ce priveşte numărul cât şi structura cromosomilor. Pe lângă plantele triploide tipice (2n=21), s-au identificat numeroşi aneuploizi şi restructurări cromosomiale (translocaţii reciproce, deleţii şi inversii), (RAICU, 1990).

4.1.7.4. Suportul genetic al variaţiilor somaclonale

A. *Apariţia de restructurări numeric cromosomiale*

Variabilitatea genetică apărută în cultura *in vitro* de celule şi ţesuturi vegetale este influenţată de genotipul plantelor donor, precum şi de condiţiile de cultivare.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre mecanismele intime ale proceselor genetice ce duc la apariţia variaţiilor somaclonale pot fi citate: poliploidia şi aneuploidia, restructurările cromosomiale, crossing-overul somatic, schimbul între cromatidele surori (*SCE*), elementele genetice mobile, amplificarea genică etc.

În culturile de celule vegetale *in vitro* s-a observat adesea multiplicarea numărului de genomuri. PRAT (1983) a regenerat 187 de plante din 82 de calusuri provenite din protoplaşti de *Nicotiana sylvestris*. Dintre acestea, numai 72 au fost diploide (2n=24), similare cu plantele de origine, toate celelalte fiind poliploide, în majoritate 4n. În mod asemănător, prin cultura de protoplaşti haploizi la aceeaşi specie, FACCIOTI şi PILET (1979) au regenerat din calusuri atât plante diploide, cât şi unele cu grade mai ridicate de ploidie. Nu s-a izolat nici un haploid.

Se pare deci că prin cultura de protoplaşti este facilitată multiplicarea numărului de genomuri. Fenomenul este relativ frecvent în cazul culturii de polen sau de antere, dar în cazul regenerării plantelor din calusuri de origine diferită. De exemplu, la *Nicotiana tabacum*, din calus generat din măduvă de tulpină de la plante haploide şi diploide aparţinând soiului *"Havana"* au fost regenerate într-o proporţie mare plante poliploide: din calusul haploid au fost regenerate plante diploide (50%) şi tetraploide (8%), iar din calusul diploid au fost regenerate plante tetraploide în proporţie de 40%, (RAICU et al., 1981).

La cartof (plantă tetraploidă, 2n=48), soiul *Bintje*, prin cultura de protoplaşti s-a obţinut calus care a generat plante care au prezentat o mare frecvenţă a variaţiilor somaclonale, (SREE RAMULU et al., 1986, citat după RAICU, 1990). Din totalul de 38 protoclone care au segregat, numai 18 aveau un fenotip normal pentru soiul respectiv şi erau tetraploide; toate celelalte au prezentat modificări fenotipice ale unuia sau ale mai multor caractere, iar din punct de vedere genetic erau aneuploide, mixoploide, una fiind octoploidă.

La *Datura innoxia*, din culturi de ţesuturi haploide au fost regenerate plante cu nivele diferite de ploidie: plante diploide (75%) şi tetraploide (20%), (BADEA şi RAICU, 1982). Tendinţa spre diploidizare în cultura de calus provenit de la plante haploide este evidenţiată de numărul mic de haploizi regeneraţi din aceste culturi (5%). Calusul cu origine diploidă a generat un număr foarte mare de tetraploizi (70%), iar

Scanned with OKEN Scanner

calusurile cu origine triploidă au diferenţiat un număr relativ mic de hexaploizi (16%). Calusurile cu origine tetraploidă şi hexaploidă nu au diferenţiat plante cu nivel mai ridicat de ploidie, ceea ce indică faptul că multiplicarea numărului de genomuri este posibilă numai până la un anumit grad de ploidie, (RAICU şi BADEA, 1981), (tabelul 4.9).

Tabelul 4.9. Numărul de cromosomi la plante de *Datura innoxia* diferenţiate din calus generat din material biologic cu nivel diferit de ploidie

Gradul de ploidie al explantului	Numărul de plante analizate	Plante cu grade diferite de ploidie									
		n		2n		3n		4n		6n	
		nr	%	nr	%	nr	%	nr	%	nr	%
n	48	2	5	36	75	-	-	10	20	-	-
2n	56	-	-	17	30	-	-	39	70	-	-
3n	33	-	-	-	-	27	84	-	-	6	16
4n	20	-	-	-	-	-	-	20	100	-	-
6n	15	-	-	-	-	-	-	-	-	15	100

Apariţia fenomenului de poliploidie în culturile *in vitro* a fost sesizată şi la alte specii de plante: în culturile de calus (în vârstă de 30 zile) la usturoi până la 70% din celule erau poliploide, majoritatea fiind tetraploide; în cazul tutunului s-au înregistrat variaţii ale numărului de cromosomi cuprinse între 27 şi 193 (faţă de 2n=48); la porumb aceste variaţii erau cuprinse între 20 şi 80 (faţă de 2n=20); în culturile de endosperm la grâu între 21 şi 200 (faţă de 2n=42) etc, (GHIORGHIŢĂ, 1992).

Plante poliploide au fost obţinute prin regenerare *in vitro* la *Asparagus officinalis* (TAKATORI et al., 1968), *Nicotiana tabacum* (KASPERBAUER şi COLLINS, 1972; RAICU et al., 1981,1982), *Lilium longiflorum* (SHERIDAN, 1975), *Pelargonium zonale* (BENNICI, 1974), *Medicago sativa* (BADEA et al., 1986), *Triticum aestivum* (BADEA et al., 1987; SHIMADA, 1973), *Solanum tuberosum* (CHIRU et al., 1997), *Beta vulgaris* (PRISECARU şi GHIORGHIŢĂ, 1995) etc. Variaţia numărului de cromosomi în culturile de calus a fost observată şi la orez (NISHI şi MITSUOKA, 1971), secară (ASANI et al., 1978) şi *orz* (ORTON, 1980).

Şi aneuploidia este un fenomen frecvent semnalat în culturile de ţesuturi şi celule vegetale pe medii artificiale. La trestia de zahăr şi tutun

Scanned with OKEN Scanner

au fost obţinuţi aneuploizi atât prin adiţia, cât şi prin reducerea numărului de cromosomi, (LIU şi CHEN, 1976; SACRISTAN şi MELCHERS, 1972). Toate aceste variaţii cromosomiale au fost asociate cu modificări fenotipice, care includ o serie de caractere importante economic. În unele cazuri s-au identificat printre plantele regenerate din protoplaşti numeroşi aneuploizi, cum a fost cazul soiului de cartof *Maris Bard* (KARP et al., 1982). La *Hordeum vulgare* şi *H. jabatum*, ORTON (1980) a efectuat un studiu comparativ asupra numărului de cromosomi în celulele din calusuri şi la plantele regenerate din aceste calusuri. Rezultatele obţinute au condus la concluzia că citodiferenţierea a fost parcursă de un număr mic de celule aneuploide. La plantele regenerate din calusul provenit din hibrizii triploizi de *Lolium* (2n=21) a fost observată o reducere a numărului de cromosomi.

Creşterea nivelului de ploidie se realizează printr-o serie de mecanisme cum ar fi: endoreduplicarea, endomitoza, fuziunea nucleară, nucleul de restituţie, împerecherea cromosomilor somatici şi crossing-overul somatic. Reducerea nivelului de ploidie poate avea la bază fenomene ca: fragmentarea nucleară sau amitoza, gruparea reducţională, reducerea cromosomilor profazici, meioza somatică. În cursul dezvoltării *in vitro* se produc perturbări în funcţionarea fusului mitotic şi în deplasarea cromosomilor din cauze puţin cunoscute, care conduc în final la fenomenele menţionate anterior, (GHIORGHIŢĂ, 1992).

Dacă plantele regenerate *in vitro* din culturile de calus, celule, microspori, protoplaşti etc, ar purta cu aceeaşi frecvenţă modificările genomice semnalate, am dispune de o sursă imensă de variabilitate şi de numeroase forme utile în acţiunea de ameliorare a unor plante. Numai că, pe parcursul proceselor de diferenţiere, organogeneză, embriogeneză şi dezvoltare, se produce un fenomen de selecţie celulară, genotipurile cu număr normal (specific) de cromosomi fiind avantajate în faţa celorlalte, astfel că majoritatea plantelor regenerate sunt totuşi diploide, (EVANS şi REED, 1981; NUTI RONCHI, 1990). Astfel, dintr-un număr de 264 de plante de usturoi regenerate din culturi de calus DOLEZEL et al. (1986) au constatat că 55,4% erau diploide, 2,2% tetraploide, 31% mixoploide, iar 10,6% aneuploide; la macul pentru opiu, DIEU şi DUNWELL (1988) au observat că din 63 de plante obţinute în culturi androgenetice 60 erau diploide, una haploidă şi două mixoploide (haplo/diploide); la grâu, EDALLO et al. (1981) au identificat printre cei 110 regeneranţi din

Scanned with OKEN Scanner

culturile de calus doar un tetraploid şi un trisomic. Potrivit informaţiilor lui PHILLIPS et al. (1988) la grâu au fost realizate culturi monosomice pentru cromosomii 2, 6, 7, 9 şi 10, şi trisomice pentru cromosomii 1, 3 şi 4. Plantele de *Paspalum dilatatum* regenerate din calus embriogen prezentau o variaţie largă a numărului de cromosomi: una din somaclone prezenta în generaţia a doua între 50 şi 82 cromosomi, iar în generaţia a treia s-au identificat plante cu variaţii cuprinse între 34 şi 108 cromosomi, (COHEN et al. 1990).

Se poate aprecia, pe baza informaţiilor de mai sus, că metoda culturilor de celule şi ţesuturi vegetale *in vitro* este un instrument eficient de poliploidizare şi aneuploidizare a plantelor. Apariţia în acest gen de culturi a unor celule cu grade variate de ploidie sau aneuploide permite selecţia de linii celulare mutante fără utilizarea de mutageni. S-a constatat însă că uneori variabilitatea cromosomială în cultura de celule duce la pierderea totipotenţei şi deci a capacităţii regenerative.

B. *Apariţia de schimbări în structura cromosomilor*

În culturile *in vitro* alături de schimbările numeric cromosomiale se produc, uneori cu frecvenţă chiar mai mare decât acestea, *schimbări în structura cromosomilor*. Fenomenele de rupere şi reunire a cromosomilor în alte configuraţii decât cele normale, precum şi pierderea de material genetic sunt obişnuite în culturile *in vitro* şi au ponderea lor în realizarea variaţiei somaclonale. Cele mai frecvente restructurări cromosomiale care apar în culturile *in vitro* la plante sunt ruperea-reunirea cromosomilor şi a cromatidelor, deleţiile, inversiile, translocaţiile, etc. Acestea pot cauza pierderea unor gene, funcţionarea anormală a altora, expresia unor gene silenţioase etc.

Într-o lucrare de sinteză, în care au luat în discuţie bazele cromosomiale ale variaţiei somaclonale, LEE şi PHILLIPS (1989) arătau că fragmentarea cromosomilor pare a avea importanţă fundamentală; ea poate fi însoţită de pierderi de material genetic (care poate merge până la eliminarea braţelor unor cromosomi), sau de fenomene de schimb între segmentele de cromosomi omologi şi neomologi, mai rar de duplicaţii. Într-un studiu efectuat pe culturi organogene de grâu, autorii amintiţi arătau că cca 48% din plantele regenerate după 32-36 săptămâni de cultivare *in vitro* purtau schimbări genetice: majoritatea erau reprezentate de schimbări structural-cromosomiale, în special translocaţii (42%), deficienţe şi duplicaţii (54%), (GHIORGHIŢĂ, 1992).

Scanned with OKEN Scanner

Rupturile de cromosomi par să se producă de regulă în zonele heterocromatice (cel mai adesea între knob şi centromer) după cum au demonstrat observaţiile unor autori pe culturi de calus şi la plantele regenerate de ovăz, ţelină, triticale etc. După opinia lui SACRISTAN (citat după LEE şi PHILLIPS, 1989) regiunile heterocromatice ale cromosomilor ar fi mai vulnerabile la fluctuaţiile din cadrul ciclului celular, ele replicându-se mai târziu decât cele eucromatice. La porumb şi *Crepis capilaris* s-a observat o incidenţă înaltă a restructurărilor cromosomiale în regiunea organizatorului nucleolar, (PHILLIPS et al., 1988).

Creşterea frecvenţei restructurărilor cromosomiale are loc prin cultivarea *in vitro* pe perioade îndelungate. LAPITAN et al. (1981) au cultivat embrioni imaturi de la hibridul interspecific grâu-secară timp de 222 zile, generând calusuri. Plantele regenerate din calusuri au fost tratate cu colchicină pentru inducerea amfiploidiei. Prin metoda de bandare C, autorii au efectuat cariotipuri la un număr de 10 amfiploizi şi au identificat trei translocaţii între cromosomii grâului şi secarei, o translocaţie între cromosomii grâului, şapte deleţii şi cinci amplificări în regiunea benzilor heterocromatice ale cromosomilor de secară. De exemplu, un amfiploid prezenta o translocaţie reciprocă între cromosomul 4D de la grâu şi cromosomul 1R de la secară, iar un altul o translocaţie între cromosomii 6B şi 5A de la grâu, (RAICU, 1990). Amintim că grâul (*Triticum aestivum*) este un hexaploid natural (2n=6x=42), având trei genomuri diferite (notate cu A, B şi D), iar secara (*Secale cereale*) este un diploid (2n=2x=14), având un singur genom (notat cu R).

Instabilitatea cromosomială este o caracteristică a culturilor *in vitro* de celule vegetale ceea ce determină schimbări genotipice şi implicit fenotipice ale regeneranţilor. BADEA şi RAICU (1984), consideră că pierderea unor gene datorate restructurărilor cromosomiale determină anularea funcţiei lor, dar poate fi declanşată în acelaşi timp activarea altor gene care în mod normal nu funcţionează.

C. *Amplificarea genică*

Ca răspuns la mediul de cultură şi, în general faţă de condiţiile de cultivare *in vitro*, pe parcursul diferenţierii celulelor şi ţesuturilor vegetale, este influenţat procesul de replicare a materialului genetic. În acest fel, unele gene pot fi replicate în mod repetat, ele găsindu-se astfel

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

într-un număr mai mare de exemplare/genom haploid. Acest fenomen poartă numele de *amplificare genică*. În condiţiile cultivării *in vitro* poate avea loc o selecţie a genotipurilor care prezintă gene amplificate. De exemplu, cultivând celule de animale în prezenţa unor concentraţii mărite de *metotrexat*, urmată de selecţii treptate, SCHIMKE (1980) a demonstrat că în celulele respective are loc o multiplicare de până la 200 de ori a genei ce determină sinteza enzimei *dihidrofolat – reductaza.* Aceasta are rolul de a asigura celulelor respective rezistenţa la metotrexat. Deci, prezenţa toxinei în mediul nutritiv a determinat fenomenul de amplificare a genei, care va sinteza în consecinţă o cantitate mai mare a enzimei dihidrofolat – reductaza.

Inducerea fenomenului de amplificare genică a fost realizată şi în culturile de celule şi ţesuturi vegetale. Astfel, la porumbul cu *citoplasmă T*, sensibilă la toxina T de la *Drechslera maydis*, GEGENBACH et al. (1980) au realizat culturi de celule şi ţesuturi. În mediile de cultură s-a introdus în cantitate mare toxina amintită anterior. În urma unor cultivări şi selecţii repetate pe astfel de medii, s-au obţinut forme rezistente la toxina T, din care au fost regenerate plante rezistente. Explicaţia apariţiei acestor variaţii somaclonale se datorează fenomenului de multiplicare a genei care determină implicit sinteza în cantitate crescută a enzimei cu rol de inactivare a toxinei T.

RAICU (1990) aprecia că prin metoda ciclurilor succesive de selecţie, în culturi de celule şi ţesuturi vegetale, pe medii cu cantităţi mărite ale unor substanţe faţă de care se urmăreşte instalarea rezistenţei, se pot obţine somaclone utile în ameliorarea plantelor. În acest fel se pot realiza, de exemplu, genotipuri rezistente la boli, dăunători, salinitate, aciditate, erbicide etc.

D. *Mutaţiile genice nucleare şi extranucleare*

Alături de modificări ale cariotipului amintite anterior, în cultura de celule vegetale *in vitro*, sub influenţa condiţiilor particulare de mediu, apar o serie de mutaţii ce pot afecta materialul genetic nuclear sau citoplasmatic. Astfel, în 1987, EVANS şi SHARP (citaţi după RAICU, 1990), au evidenţiat 13 mutaţii genice nucleare la 230 de plante de tomate regenerate din calusul format pe explant de frunză.

Tot RAICU (1990), îl citează pe GENGENBACH (1980), care împreună cu colaboratorii au evidenţiat apariţia unor somaclone printre plantele regenerate din culturi de celule la porumb, datorită unor mutaţii

genice extranucleare, care afectează genomul mitocondrial. Se consideră că acest tip de mutaţii afectează rezistenţa la diferite boli, precum şi la antibiotice. De exemplu, din cele peste 10.000 de protoclone studiate de SHEPARD (1980) la cartof (soiul *Russet Burbank*), dintre variaţiile somaclonale izolate, unele au fost rezistente la *Alternaria solani* şi *Phitophtora infestans* (BADEA şi RAICU, 1984).

E. *Metilarea unor secvenţe de ADN*

Relativ recent s-a constatat că reglajul activităţii genelor la eucariote este influenţat de fenomenul de metilare a unor secvenţe de ADN. S-a constatat că secvenţa de nucleotide CG (citozină - guanină) este adesea metilată, fenomen prin care apare acidul 5-metil-dezoxicitidilic (m^5C). Dacă secvenţa CG într-o catenă de ADN este metilată, are loc în mod obligatoriu şi metilarea secvenţei CG în catena complementară de ADN. Fenomenul de metilare are loc de obicei după replicaţia ADN-ului şi a fost pus în evidenţă cu ajutorul enzimelor de restricţie, care recunosc anumite secvenţe de nucleotide, (RAICU, 1990).

La eucariote s-a demonstrat experimental că genele active sunt în stare submetilată, iar cele inactive sunt metilate. Legat de această observaţie se consideră că fenomenul de metilare – demetilare a diferitelor secvenţe de ADN, ar reprezenta un mecanism de reglaj genetic la eucariote.

Metilarea unor secvenţe de ADN se poate realiza în mod stabil în cursul diferenţierii celulare. În anumite condiţii de mediu (cum ar fi şi cultura de celule *in vitro*) fenomenul poate fi reversibil. De exemplu, genele ADNr sunt responsabile de sinteza ARNr, care intră în structura ribozomilor. În celulele unde are loc sinteza proteică, genele ADNr se află în stare submetilată, ele fiind active (sintetizează ARNr). În schimb, în celulele inactive în privinţa sintezei proteice, genele ADNr sunt puternic metilate, deci inactive.

Se consideră că şi în cultura *in vitro* activarea sau inactivarea genelor se realizează şi prin fenomenele de metilare-demetilare ale unor secvenţe de ADN. Aceste fenomene pot determina apariţia unor variaţii noi, care pot fi considerate variaţii somaclonale. Ca urmare, unele gene silenţioase, deci nefuncţionale, pot deveni funcţionale. Aşa se explică apariţia în culturile *in vitro* a unor caractere noi (sinteza unor principii active noi la plantele medicinale, de exemplu) nespecifice. În cultura *in vitro* la o linie de *Catharanthus roseus* s-au identificat 13 alcaloizi

Scanned with OKEN Scanner

diferiţi. Şase dintre aceştia n-au fost niciodată decelaţi în planta respectivă. Din cei 6 alcaloizi, 3 s-au dovedit a fi sintetizaţi de alte specii ale aceluiaşi gen, iar 3 n-au fost niciodată descrişi în stare naturală la plante, (RAICU, 1990).

Ca rezultat al aceluiaşi fenomen a fost evidenţiată o mărire spectaculoasă a cantităţii unor produşi în cultura de celule *in vitro*, în comparaţie cu cantitatea produsă de planta crescută în condiţii obişnuite. Astfel, la *Thalictrus minus* cantitatea de *berberină* a crescut de 1000 de ori în cultura de celule, comparativ cu planta intactă; la *Nicotiana tabacum* producţia de *ubiquinonă* a crescut de 173 de ori; la *Coffea arabica* cantitatea de *cafeină* era mai mare de 92 de ori. Putem aprecia astfel că în reglajul genetic al activităţii genelor au loc modificări importante, datorate condiţiilor particulare de cultivare *in vitro* ale celulelor, ceea ce determină şi activarea unor gene silenţioase din genomul celular.

F. *Recombinarea genetică mitotică reciprocă şi nereciprocă*

Pe lângă fenomenele amintite care determină apariţia variaţiilor somaclonale, condiţiile particulare ale cultivării *in vitro* determină apariţia cu frecvenţă ridicată şi a altor evenimente. Este vorba de: *crossin-overul somatic*, care uneori este asimetric, de *schimburile între cromatidele surori* (*SCE*), care uneori determină deleţii sau duplicaţii, precum şi de *conversia genică* în timpul mitozei. Acestea determină o serie de repercursiuni neechilibrate asupra „aranjamentului" genotipic iniţial, ceea ce favorizează apariţia unor variante genetice noi.

La porumb, Mc COY (1980) arăta că plantele regenerate *in vitro* sunt complet fertile şi au toate boabele zaharoase, deşi calusul din care au fost regenerate era heterozigot pentru alela recesivă *zaharos*. Autorul a presupus că rezultatul s-ar datora fie unei mutaţii, fie unei recombinări somatice. Apariţia sectoarelor homozigote în ţesutul de proveniență heterozigotă se datorează, probabil, fenomenului de recombinare somatică.

BARBIERI şi DULIEU (1983) au raportat variaţii genetice în protoplaştii din calus de tutun şi în plantele regenerate din aceşti protoplaşti, provenite din recombinările somatice implicând locii *al* şi *yg*.

A fost evidenţiată de asemenea conversia genică şi în cursul mitozei, de exemplu la *grâu* şi *cartof*. Acest fenomen constituie de fapt un schimb nereciproc de gene între diversele genomuri, cu implicaţii

Scanned with OKEN Scanner

genotipice şi fenotipice foarte importante, (RAICU, 1990). LARKIN et al. (1981) au obţinut plante homozigote de grâu pentru genotipuri non-parentale, la loci care afectează culoarea testei bobului şi dezvoltarea spicului. Ei au presupus câteva cauze posibile care au dus la acest rezultat şi anume: transferul nereciproc de informaţie genetică între secvenţele repetate de ADN şi conversia genelor.

G. *Activarea elementelor transpozabile*

După părerea lui McCLINTOCK (citată după PESCHKE şi PHILLIPS, 1991) prezenţa cromosomilor rupţi într-o celulă ar provoca un adevărat "stres (şoc) genomic". Din acest motiv ar fi activate elementele transpozabile aflate în genom sub formă inactivă. Autorii menţionaţi mai sus au confirmat ipoteza, constatând că la regeneranţii de porumb puteau fi decelate elementele transpozabile *Ac* (*Activator*) şi *Spm* (*Supresor-mutator*), care fuseseră activate în cultura *in vitro*. Elementul *Ac* era prezent la 2-3% din plantele regenerate, (GHIORGHIŢĂ, 1992).

Activarea elementelor silenţioase transpozabile a fost detectată atât la plantele regenerate *in vitro*, cât şi la descendenţii acestora. Mecanismele prin care transpozonii acţionează asupra genomului sunt: inducerea de mutaţii la locul transpoziţiei, inactivarea totală sau parţială a unor gene, determinarea de restructurări cromosomiale (deleţii, duplicaţii, inversii, rupturi cromosomiale sau cromatidice), recombinarea genetică nereciprocă.

În condiţiile cultivării *in vitro* se realizează o destabilizare a genomului nuclear, mitocondrial şi cloroplastic, fapt care determină adesea un *flux de gene* între cele trei tipuri de genomuri ale celulei vegetale. Elementele transpozabile au un rol important în evoluţia rapidă a genomului în cultura de celule *in vitro*, prin aceea că se creează o mare diversitate genetică şi posibilitatea sintezei de noi proteine.

Transpoziţia unor segmente de ADN a fost evidenţiată la porumb şi de EVOLA et al., (1984). Ei au observat reactivarea elementului *Spm* la aproape jumătate din plantele regenerate, iar un an mai târziu (1985) au semnalat de asemenea, într-un alt studiu, activarea elementului *Ac*. La lucernă (*Medicago sativa*), GROOSE şi BINGHAM (1986) constată că activarea elementelor transpozabile determină frecvent reversia şi instabilitatea alelelor precum şi descoperirea de noi alele la locusul ce afectează pigmentaţia frunzelor. Acest fenomen determină apariţia la plantele regenerate a pigmentaţiei antocianice.

Scanned with OKEN Scanner

Pe baza descoperirii fluxului de gene în celula eucariotă vegetală, se vorbeşte în prezent de un fenomen de coevoluţie a sistemelor genetice nuclear, mitocondrial şi cloroplastic. Genomul celulelor eucariote se află astfel într-o stare de flux dinamic, fenomen pus în evidenţă mai ales prin cultura de celule *in vitro* care determină destabilizarea genomului şi în consecinţă, crearea unei mari variabilităţi genetice, (RAICU, 1990).

4.1.7.5. Tipuri de mutaţii somaclonale şi identificarea lor

Elaborarea unor metode eficiente pentru cultura de celule şi ţesuturi vegetale a făcut posibilă dezvoltarea cercetărilor privind genetica celulei somatice, folosirea sistemului biologic reprezentat de celulele vegetale *in vitro* pentru producerea artificială de mutaţii şi selecţia lor în diferite scopuri.

Cercetările de inducere şi selecţie a mutaţiilor *in vitro* au arătat avantajele acestui sistem biologic, comparativ cu metodele convenţionale, dintre care menţionăm:

- permit aplicarea cu uşurinţă a tratamentelor cu agenţi mutageni asupra unui număr foarte mare de celule;
- oferă posibilitatea de a supune celulele tratate unor procedee de selecţie în condiţii de mediu controlate;
- asigură izolarea rapidă a unor mutante recesive în condiţiile cultivării unor celule haploide.

Evident că mutaţiile sunt considerate "reale" numai dacă din liniile celulare selecţionate pot fi regenerate plante capabile să transmită la descendenţi caracterul mutant.

Materialul vegetal care poate fi supus tratamentului cu agenţi mutageni poate fi reprezentat de: plante sau organe de plante, populaţii omogene de celule vegetale, calus, antere, grăunciori de polen sau embrioni.

Mutaţiile naturale sau induse artificial în cultura *in vitro* sunt în general de trei tipuri:

- *mutante auxotrofe*, care necesită pentru creşterea lor *in vitro* suplimentarea mediului de cultură cu unele componente chimice, pe care celulele nu le pot sintetiza singure;
- *mutante autotrofe*, care sunt capabile să trăiască pe medii deficiente, pe care tipul nornal (sălbatic) nu se poate dezvolta

Scanned with OKEN Scanner

(sunt capabile de sinteză proprie în privința componentelor chimice de care au nevoie);

- *mutante rezistente* la diverse substanțe chimice sau antimetaboliți precum și la diverse condiții nefavorabile de mediu, (GHIORGHIȚĂ, 1999).

Pentru izolarea mutațiilor care apar în cultura *in vitro* se folosesc unele strategii ca:

- impunerea stressului, metodă care asigură doar diviziunea și supraviețuirea celulelor rezistente la factorul de stress;
- identificarea de markeri biochimici, care presupune prezența sau absența unui acid nucleic, a unei enzime sau altei molecule corelată cu exprimarea caracterului selectat, identificată și folosită ca bază de selecție, (INGRAM, 1986).

4.1.7.6. Inducerea variabilității genetice *in vitro* prin intervenția cu agenți mutageni

Variabilitatea genetică sau variația somaclonală este determinată de însăși metoda de cultivare *in vitro* a celulelor și țesuturilor vegetale. Fenomenul de variație somaclonală a fost descris ca o sursă de mutanți regenerați *in vitro* sau de noi variante la unele specii, (DUNCAN, 1997).

Rezultatele remarcabile obținute în mutageneza experimentală în culturi generative în deceniile 6-9 ale secolului trecut i-au determinat pe unii specialiști să folosească agenții mutageni în acțiunea de amplificare a variabilității somaclonale. Se pune în mod firesc întrebarea: de ce să intervenim cu agenți mutageni dacă și așa, în culturile *in vitro* se înregistrează o variație genetică spontană însemnată, (THOMAS et al., citați după MICKE et al., 1987). E greu de dat un răspuns satisfăcător la această întrebare, și totuși unele argumente ar fi. S-a constatat spre exemplu, că tratamentele cu mutageni ale culturilor *in vitro* cresc frecvența de mutație; plantele de banan regenerate de NOVAK et al. (1990) din culturi de celule în suspensie iradiate gamma cu 10-60 Gy prezentau o variabilitate fenotipică importantă. Tratamentele cu mutageni ar determina totodată diversificarea spectrului mutațiilor, provocând o serie de perturbări genetice care nu se produc în mod spontan. Mutageneza *in vitro* față de cea în culturi generative mai are avantajul că poate fi aplicată pe celule unice (inclusiv haploide), din care pot fi apoi regenerate plante, și nu pe sisteme pluricelulare cum este sămânța (cel

Scanned with OKEN Scanner

mai frecvent folosită *in vivo*). Este un motiv pentru care se recomandă aplicarea mutagenilor mai ales pe culturi de protoplaşti, celule în suspensie, culturi de calus etc. Ameliorarea prin mutaţii folosind tehnicile *in vitro* este considerată un instrument util de evitare a chimerismului la plante şi de intensificare a regenerării mutaţiilor induse, (GHIORGHIŢĂ, 1990, 1992).

Mutageneza *in vitro* este una din metodele care permite tratarea cu mutageni a unui număr mare de indivizi (a calusului somatic sau suspensiilor celulare), urmată de regenerarea şi selecţia mutanţilor doriţi (AHLOOWALIA, 1995). Creşterea variabilităţii genetice poate fi indusă în populaţii largi şi omogene de celule vegetale sau în culturi de calus, prin expunerea culturilor (sau a plantelor înaintea prelevării explantelor) la agenţi mutageni fizici şi chimici. Aceşti agenţi determină creşterea frecvenţei schimbărilor produse materialului genetic, când culturile sunt plasate în condiţii care permit apariţia rapidă a mutaţiilor.

În cazul tratamentelor cu radiaţii se pot folosi două metode:

- iradierea materialului vegetal (explante, calus, antere, protoplaşti) în condiţii sterile, urmată apoi de inocularea acestuia pe medii de cultură aseptice;
- iradierea materialului vegetal în flaconul de cultură. În acest caz, celulele sau ţesuturile iradiate fie rămân în acelaşi vas, fie sunt transferate rapid pe un mediu proaspăt, după iradiere.

Dacă materialul vegetal rămâne în acelaşi flacon, unde a avut loc iradierea, se adaugă încă un factor de stress care influenţează frecvenţa de apariţie a mutaţiilor, datorită prezenţei radicalilor liberi care pot afecta indirect materialul biologic.

Dozele şi debitele de iradiere trebuie alese după experienţe preliminare, pentru stabilirea radiosensibilităţii materialului vegetal, precum şi a timpului de expunere la sursa de iradiere. Acestea pot varia în funcţie de specia şi de explantul ce trebuie iradiat. În general, se folosesc debite mai mici de iradiere decât în cazul tratamentelor aplicate seminţelor. Dozele utilizate trebuie să permită o supravieţuire de 40-60% a populaţiei în comparaţie cu culturile neiradiate. Dozele mai puternice permit o supravieţuire mai redusă. Tratamentul cu mutageni în cultura *in vitro* este mai complicat decât tratamentul tradiţional (iradierea seminţelor). El seamănă într-o oarecare măsură cu tratamentul organelor vegetative (rizomi, butaşi, tuberculi).

Scanned with OKEN Scanner

În cazul folosirii agenților mutageni chimici, substanțele cu efect mutagen se adaugă, în general, prin filtrare în mediul de cultură autoclavat anterior, pentru a nu anula efectul mutagen al substanțelor introduse în mediu. Materialul vegetal se va transfera pe un mediu proaspăt (lipsit de agentul mutagen), după o anumită perioadă de timp, stabilită anterior prin experiențe. În cazul suspensiilor celulare, celulele vor fi trecute într-o altă soluție nutritivă (fără mutageni). Tratamentul chimic se poate face și direct pe celulele și țesuturile ce urmează a fi inoculate. După încheierea timpului de acțiune a mutagenului, materialul vegetal va fi spălat și apoi inoculat pe medii de cultură aseptice.

Indiferent de tipul agentului mutagen folosit, după tratamente culturile trebuie plasate pe un mediu normal de creștere și de subcultivare sau plasate direct în condiții selective care să permită descoperirea mutațiilor. De exemplu, la trestia de zahăr, KHAN et al. (1999) au determinat condițiile pentru mutageneza fizică și chimică a calusului. Cultura de calus s-a obținut din explante de lăstari de 8 săptămâni de la plante de *Saccharum officinarum* L. cultivate în ghivece. Calusul obținut a fost tratat cu agenți mutageni fizici și chimici. S-au folosit dozele de raze γ de 10 și 15 Gy sau soluții de 2mM de N-nitroso-N-metiluree (MNH), aplicate timp de 2 și 3 ore. După iradiere, o parte din calus a fost transferat direct pe un mediu proaspăt, mediu neionizat (metoda IC), iar restul calusului s-a menținut pe mediul iradiat - 4 săptămâni, deoarece el fusese schimbat pe mediul proaspăt cu o zi înainte de iradiere (metoda ICM). După o lună de cultivare pe mediul de inducție s-a măsurat sporul de substanță proaspătă la fiecare probă de calus și cultura s-a transferat pe mediul de regenerare. După 8 săptămâni de cultivare pe mediul de regenerare s-au înregistrat datele asupra capacității de regenerare, (tabelul 4.10). S-a estimat de asemenea frecvența lăstarilor care manifestă deficiențe clorofiliene (variații clorofiliene) printre regeneranți.

S-a constatat inhibarea creșterii calusului, comparativ cu martorul, la fiecare cultură tratată, și reducerea aportului în substanță proaspătă de la 42 până la 91%. Ambii mutageni, la toate dozele folosite, au influențat negativ nivelul de regenerare a plantelor.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4.10. Influența tratametului cu radiații gamma și MNH asupra capacității de regenerare a calusului la trestia de zahăr, (KHAN et al., 1999)

Tratament	Doza	Acumularea de subst. pr. a calusului (g)	Reducerea în subst. pr. (%)	Numărul de lăstari regenerați	Capacitatea de regenerare (%)	Frecvența variantelor cu deficiențe clorofiliene (%)
Radiații gamma (Gy)						
IC	0	0.66 ± 0.35	0	1351	0	2.1
	10	0.39 ± 0.18	42	847	27	3.3
	15	0.16 ± 0.05	77	486	65	5.0
ICM	0	0.65 ± 0.12	0	925	0	1.0
	10	0.08 ± 0.02	88	350	62	5.0
	15	0.05 ± 0.02	91	258	72	8.0
	MNH (mM x h)					
	0	0.54 ± 0.12	0	1092	0	0.9
	2 x 2h	0.15 ± 0.05	72	398	64	4.5
	2 x 3h	0.06 ± 0.02	89	305	72	7.8

La combinațiile cele mai nocive (15 Gy – ICM și MNH – 2mM x 3h) s-a observat o reducere cu 72% a capacității de regenerare. S-a înregistrat de asemenea o creștere a frecvenței variantelor cu deficiențe clorofiliene în urma tratamentelor cu aceste concentrații și doze de MNH, respectiv raze γ (7,8 și respectiv 8,0%). Cele mai frecvente variații au fost lăstarii "albino", dar s-au obținut și unii de culoare verde deschis sau striați.

Cu ajutorul radiațiilor ionizante, din explante de *crizantemă* tratate, HUITEMA et al. (1986) au izolat două mutante tolerante la temperaturi scăzute și 25 mutante cu înflorire timpurie, iar JERZY a regenerat plante (provenite din vârfuri de lăstari iradiate cu 15 Gy) care prezentau o variabilitate importantă a culorii florilor. Plantele de *Musa* sp. regenarate de NOVAK et al. (citat după GHIORGHIȚĂ, 1990) din culturi de celule în suspensie iradiate gamma (cu doze de 10 – 60 Gy) aveau o variabilitate fenotipică evidentă. Tratamentul cu radiații gamma (70 Gy) aplicate celulelor și protoplaștilor de *Citrus* sp. de DENG ZHANG et al. (citați după GHIORGHIȚĂ, 1990), provocau cromosomi

Scanned with OKEN Scanner

retardatari, micronuclei etc, care puteau conduce la sterilitate şi mutanţi cu fructe fără seminţe. Celulele de calus habituat care au supravieţuit tratamentului cu mutageni au fost expuse stresului cu NaCl, acţiune care a condus la selecţia de plante tolerante la salinitate. În condiţii de stress salin, liniile mutant prezentau un conţinut mai mare de proteine decât liniile iniţiale şi cu 30 – 70% mai multă prolină.

S-a constatat că odată cu creşterea dozelor de iradiere şi efectele induse sunt mai puternice (inclusiv ratele de mutaţie sunt mai mari), că în funcţie de vârsta explantelor şi de debitul de iradiere, radiosensibilitatea materialului biologic se schimbă, că însăşi fracţionarea dozelor de iradiere influenţează efectele induse, că există o sensibilitate diferită la radiaţii în funcţie de stadiul de diferenţiere a materialului iradiat, că protoplaştii sunt mai sensibili la iradiere decât celulele în suspensie etc, (GHIORGHIŢĂ, 1992).

Apelând la tratamente cu nitrozo-metil-uree (NMU), DIX şi Mc CABE (1990) au obţinut un dublu mutant de *Solanum nigrum* rezistent la antibioticele streptomicină şi spectinomicină, iar ROBINSON et al. (1990) mutanţi de conopidă rezistenţi la streptomicină şi gentamicină. Prin tratamentul cu N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidină a protoplaştilor haploizi din mezofil de *Hyoscyamus muticus* s-au obţinut mutanţi auxotrofi (care necesitau suplimente de nicotinamidă, histidină, triptofan etc), ca şi mutanţi sensibili la temperatură, (GEBHARDT et al.,1981).

Variantele fenotipice dorite, apărute în urma tratamentelor cu mutageni, sunt alese conform condiţiilor specifice ale mediului preparat pentru selecţia rezistenţei, autotrofiei, auxotrofiei sau altor fenotipuri. De exemplu, selecţia mutantelor pentru rezistenţă se face prin incubarea suspensiilor de celule sau de protoplaşti într-un mediu la care se adăugă droguri (erbicide, analogi ai bazelor, toxine, săruri etc) sau în condiţii de mediu stressante (frig, temperatură înaltă etc).

Exemplele prezentate anterior sugerează interesul cercetătorilor de a intensifica fenomenul de apariţie a mutaţiilor în culturile *in vitro* folosind diverşi agenţi mutageni. Cercetările în acest domeniu sunt în curs şi de aceea sunt încă destule aspecte neclare şi de pus la punct în legătură cu eficienţa acţiunii de inducere a mutaţiilor *in vitro*, în funcţie de: tipul culturii (explante, polen, calus, celule în suspensie, protoplaşti etc), dozele şi concentraţiile optime ale mutagenilor, mediile de cultură adecvate, frecvenţa subcultivărilor, vârsta culturii etc. Deşi frecvenţa

Scanned with OKEN Scanner

variaţiilor induse creşte cu doza de mutagen, alegerea acestei doze trebuie să aibă în vedere nu numai frecvenţa de mutaţie, ci şi efectele ei asupra proceselor de diferenţiere, a capacităţii de regenerare a plantelor etc, (GHIORGHIŢĂ, 1990).

Culturile *in vitro* pot fi folosite şi în acţiunea de multiplicare a unor mutante valoroase obţinute, precum şi în salvarea plantelor provenite din seminţe tratate cu doze letale de mutageni. Este bine cunoscut faptul că pe măsura creşterii presiunii agentului mutagen asupra materialului biologic (*in vivo* sau *in vitro*) creşte şi rata de mutaţie. Numai că tratamentele severe (cu doze letale) aplicate seminţelor, tratamente care nu anulează capacitatea lor germinativă, nu permit supravieţuirea plantelor provenite din ele. Unii autori s-au gândit să apeleze la culturile *in vitro* pentru depăşirea acestui neajuns. Astfel ZUBKO et al. (1990), în experienţe cu doze letale de radiaţii gamma (100 – 500 Gy) aplicate seminţelor a 10 specii de plante din familii diferite, au constatat că viabilitatea plantelor provenite din seminţele iradiate poate fi asigurată prin cultivarea şi regenerarea lor *in vitro*. Restaurarea potenţialului proliferativ al plantelor pe medii de calusare avea loc chiar şi după folosirea unor doze neobişnuit de ridicate, (GHIORGHIŢĂ, 1992).

Totodată, aceste rezultate vin să confirme conceptul privind existenţa la plante a aşa-ziselor "sisteme de siguranţă", sisteme elaborate în cursul evoluţiei lor, ca o reacţie de apărare, şi care sunt menite să le asigure supravieţuirea în condiţii improprii de viaţă. În acest caz ar putea fi vorba de "centri de siguranţă" constituiţi dintr-o celulă sau, mai probabil, dintr-un grup de celule cu radiorezistenţă extrem de ridicată, care reuşesc să-şi păstreze viabilitatea, dar care nu pot supravieţui din cauza "mediului nociv" în care se găsesc, şi alterării de către agentul mutagen a proceselor de integrare la nivelul organismului (plantei), (GHIORGHIŢĂ, 1992).

Tratamentele cu radiaţii (doze letale de radiaţii X şi gamma) sunt de asemenea folosite în hibridările somatice, în eliminarea specifică a unei părţi din nucleul protoplaştilor iradiaţi, în realizarea de hibrizi nucleari asimetrici între specii înrudite şi îndepărtate filogenetic, (GLEBA şi SHLUMKOV, 1990).

Se speră într-un progres remarcabil al ameliorării prin folosirea mutaţiilor induse la haploizi (obţinuţi în mod obişnuit din cultivarea

Scanned with OKEN Scanner

anterelor), metodă care permite, aşa cum am arătat deja, identificarea mutantelor chiar în generaţia consecutivă tratamentului mutagen, datorită prezenţei în genomul lor a unui singur set de cromosomi şi deci a absenţei fenomenului de dominanţă/recesivitate. Toate plantele M_2 diploidizate vor manifesta mutaţia indusă de agenţii folosiţi. Şi mai promiţătoare apare folosirea în acest gen de cercetări a suspensiilor de celule haploide, cu condiţia să se pună la punct regenerarea eficientă de plante din celule unice. Oricum, tehnicile *in vitro* pot asigura deja micropropagarea eficientă a unor mutante (aşa cum se preciza anterior) şi răspândirea în cultură a acestora, mai ales în cazul speciilor ce se înmulţesc vegetativ. Cu siguranţă folosirea mutaţiilor induse *in vitro* va avea partea ei de contribuţie la o nouă revoluţie în domeniul ameliorării. Referitor la acestă idee, MICKE et al. (1987) afirma că "ameliorarea prin mutaţii este tocmai la început de a juca un rol major în ameliorarea plantelor".

4.1.7.7. Specularea în practică a variabilităţii somaclonale

Încă din 1976, SKIRVIN şi JANICH au subliniat importanţa variantelor clonale în ameliorarea plantelor horticole. Ulterior, SHEPARD et al. (1980) au demonstrat existenţa unei mari variabilităţi printre protoclonele regenerate din cultura de protoplaşti din frunzele de cartof, soiul *Russet Burbank*, şi au realizat selecţia a numeroase somaclone cu caractere utile în ameliorare. Acelaşi fenomen a fost demonstrat şi în cazul plantelor care se reproduc sexuat. De exemplu, OONO (1981) a obţinut peste 800 de somaclone la *orez* derivate dintr-o linie homozigotă provenită din diploidizarea spontană a unui haploid. Dintre acestea numai 28% erau plante similare fenotipic cu materialul de origine, restul prezentând numeroase mutaţii, asemănătoare într-o anumită măsură cu cele induse cu ajutorul radiaţiilor ionizante.

SCOWCROFT şi LARKIN (1984) au sesizat o mare variabilitate a unor caractere la plantele de cultură în urma procesului de cultivare *in vitro*. În tabelul 4.11 prezentăm modul cum variază unele caractere ale plantelor de cultură în condiţiile cultivării lor *in vitro*.

Practicarea metodelor de cultivare a celulelor şi ţesuturilor vegetale *in vitro* poate asigura obţinerea de genotipuri noi la plante, fără utilizarea hibridării sexuate sau a agenţilor mutageni, într-un timp mult mai scurt. Tehnica producerii de somaclone care manifestă rezistenţă la

Scanned with OKEN Scanner

boli, dăunători şi alţi factori stresanţi din mediul ambiant, trebuie completată adesea cu folosirea selecţiei repetate la nivel celular, astfel încât genotipurile dorite să poată fi identificate rapid şi utilizate în ameliorare.

Tabelul 4.11. Caractere ce prezintă o mare variabilitate la plantele cultură, în urma cultivării lor *in vitro* (după RAICU, 1991)

Specia	Explantul	Caracterele ce variază
a) *Monocotiledonate*		
Avena sativa	Embrioni imaturi	Înălţimea plantelor, înspicatul
Triticum aestivum	Embrioni imaturi	Înălţimea plantelor, maturitatea, înfrăţirea, amilaza
Oryza sativa	Embrionii semințelor	Înfrăţirea, mărimea paniculului, fertilitatea, precocitatea, înălţimea plantei
Saccharum officinarum	Variate	Lungimea auriculelor, producţia de zahăr, rezistenţa la maladii
Zea mays	Embrioni imaturi	Endospermul, rezitenţa la toxina T de la *D. maydis*, ANDmt
b) *Dicotiledonate*		
Solanum tuberosum	Protoplaste, calus din frunze	Forma tuberculilor, producţia de tuberculi, morfologia tulpinii, frunzelor şi florilor, rezistenţa la maladii
Nicotiana tabacum	Antere, protoplaste	Înălţimea plantelor, forma frunzelor, producţia de frunze, alcaloizii, clorofila
Brassica sp.	Antere, embrioni, meristeme	Precocitatea, morfologia plantelor, rezistenţa la maladii
Medicago sativa	Ovare imature	Frunze multifoliate, lungimea peţiolului, înălţimea plantelor, producţia de substanţă uscată

În cele ce urmează vom relua unele din rezultatele obţinute în specularea în practică a variablităţii somaclonale, prezentate într-o lucrare anterioară, (GHIORGHIŢĂ, 1992). Primul soi obţinut pe această cale a fost creat de SKIRVIN şi JANICK (1976) la *Pelargonium* şi a fost denumit *Velvet Rose*. Tehnica inducerii variabilităţii genetice prin practicarea metodelor *in vitro* la plante pare să fie una eficientă, fiind

Scanned with OKEN Scanner

utilizată la diverse specii de plante cultivate, cu scopul ameliorării producţiei şi calităţii acesteia, pentru creşterea rezistenţei plantelor la antimetaboliţi (cum sunt toxinele produse de unele boli), la erbicide, la salinitatea solului, la toxicitatea produsă de unele metale, la boli, săruri, analogi ai aminoacizilor, aciditate, fungicide, temperatură, secetă, inundare etc.

S-au obţinut, spre exemplu, linii de orez cu toleranţă la rugini, frig, concentraţii ridicate de săruri şi adaptabilitate largă; linii de grâu cu înfrăţire bună, timpurii, rezistente la salinitate şi frig, cu calitate superioară a boabelor; linii de tomate rezistente la aluminiu, linii de soia şi trifoi rezistente la erbicide; linii de varză, tutun, tomate, cartof etc, rezistente la toxinele unor boli specifice. Linii celulare şi plante cu rezistenţă la salinitate au fost izolate şi în culturi *in vitro* la lucernă (WINIKOV, 1990), *Brassica juncaea* (JAIN et al., 1990). Rezistenţa la unele pesticide a fost achiziţionată şi în culturi de morcov (SHYR şi WIDHOLM, 1990), de mazăre (EZHOVA et al., 1990), de *Chenopodium rubrum,* (THIEMANN şi BARZ, 1990).

La porumb s-au selecţionat variaţii somaclonale care sunt rezistente la *toxina T* produsă de ciuperca *Drechslera maydis*, fenomen asociat cu schimbări în genomul mitocondrial, (BRETELL et al., 1982). La trestia de zahăr s-au selecţionat variaţii somaclonale de înaltă productivitate şi rezistente la mai multe maladii, (LIU , 1981).

Transferul de gene de la speciile sălbatice la cele cultivate, se poate realiza prin cultura de celule şi ţesuturi de la hibrizi interspecifici, realizându-se astfel eliminarea barierelor care limitează schimburile de gene între specii relativ îndepărtate. Primele cercetări efectuate la unii hibrizi interspecifici şi intergenerici, cum sunt: *Lolium perenne x L. multiflorum, L. multiflorum x Festuca arundinacea, Hordeum vulgare x Secale cereale, Triticum aestivum x S. cereale, Sacharum x Zea* etc, au arătat că în faza de calus a embrionului hibrid au loc fenomene de recombinare genetică ce determină formarea de genotipuri noi, interesante pentru programele de ameliorare, (RAICU, 1990).

În China, s-au obţinut prin cultura de celule *in vitro* numai la grâu un număr de 20 de soiuri, de către 16 institute de cercetare din ţară. De exemplu, soiul de grâu de primăvară *Huapei nr.1* este rezistent la frig, are o bună înfrăţire, este precoce şi are o bună calitate. În mod similar,

Scanned with OKEN Scanner

soiurile *Junhua nr.1* şi *Junhua nr.2* sunt precoce, rezistente la rugini şi au o productivitate ridicată, (RAICU, 1990).

Prin cultura *in vitro* s-au obţinut plante de cartof, tomate şi tutun rezistente la erbicidul fosfinotricin, comercializat sub numele de *Basta*. Plantele regenerate conţin o genă ce codifică sinteza unei enzime care determină rezistenţă la erbicidul respectiv. Tot în culturi *in vitro* s-au obţinut plante de tutun foarte rezistente la atacul insectei *Manduca sexta*, care-i distruge frunzele. Izolarea unui astfel de genotip permite limitarea folosirii pesticidelor,(RAICU, 1990).

WIDHOLM (citat după HANDRO, 1981) a izolat linii celulare de morcov cu rezistenţă la analogi ai aminoacizilor şi care supersintetizau o serie de aminoacizi ca fenil-alanina, metionina, lizina şi triptofanul. ADKINS et al. (1990) au regenerat din culturi de calus plante de orez cu rezistenţă sporită la inundare, care prezentau variaţii şi în privinţa înălţimii lor, numărului şi greutăţii boabelor în spic etc. GOSAL şi BRAR au constatat că plantele de trestie de zahăr regenerate din culturi de calus la intervale cuprinse între 3 şi 12 luni prezentau o variabilitate importantă a vigurozităţii, înfrăţirii, dimensiunilor şi formei frunzelor, grosimii şi înălţimii plantelor la maturitate, spectrului unor enzime. La soia, KOMATSUDA (1990) a obţinut regeneranţi în culturi *in vitro*, via embriogeneză somatică, ale căror seminţe produceau o nouă proteină, care reprezenta 6% din proteina totală. LUKYANENKO et al. (1990) au izolat la grâu, din culturi de embrioni imaturi, o serie de somaclone ca: plante pitice, plante cu perioade diverse de înflorire, forme cu geotropism negativ, târâtoare etc, (GHIORGHIŢĂ, 1992).

Până în prezent s-au obţinut în diverse ţări soiuri cu importanţă economică la peste 10 specii de plante cultivate: grâu, orez, orz, floarea soarelui, sfeclă de zahăr, cartof, tomate, tutun, gerbera, mentă, etc. La grâu, pe lângă soiurile obţinute în China, s-a realizat în Franţa soiul *Florin* în 1985, iar la orz s-au creat soiurile *Mingo* şi *Rodea* (Canada), *Doublett* (Anglia) şi *Gwylan* (Noua Zeelandă). La tutun s-au obţinut soiurile *Tan Yuh 1*, *Tan Yuh 2* şi *Tan Yuh 3* (China), *F211* (Japonia), *NC744* (U.S.A.) etc, (RAICU, 1990).

4.2. Transferul de gene la plante şi animale

În ultimele două decenii şi jumătate transgeneza la organismele vegetale şi animale a devenit o metodă tot mai larg folosită pentru

Scanned with OKEN Scanner

transferul unor gene utile şi obţinerii unor organisme cu rezistenţă sporită la condiţiile de mediu, cu bioproductivitate superioară, capabile să utilizeze medii nespecifice etc. Dacă prin metodele clasice de ameliorare puteau fi transferate doar gene utile de la rude cultivate sau sălbatice, utilizarea ingineriei genetice permite transferul oricărei gene la oricare organism viu.

4.2.1. Vectori folosiţi în transgeneză la plante şi animale

În activitatea de transfer al genelor la plante se folosesc cel mai frecvent plasmidele *Ti* de la *Agrobacterium tumefaciens* şi Ri de la *A. rhizogenes*.

S-a constatat pe la începutul secolului trecut (SMITH şi TOWNSEND, 1907) că tumorile car apar în zona coletului unor plante (*„crown gall")* sunt provocate de *Agrobacterium tumefaciens*. Infecţia cu această bacterie are loc în urma rănirii plantei gazdă. Celulele ţesutului lezat sunt transformate genetic, cu formarea de ţesut tumoral.

După instalarea procesului, prezenţa celulelor bacteriene nu mai este necesară, observându-se apariţia de tumori secundare (un fel de „metastaze") în zone ale plantelor îndepărtate de tumora iniţială. Ţesuturile tumorale pot fi cultivate *in vitro* pe medii lipsite de fitohormoni. Aceste ţesuturi au şi proprietatea de a sintetiza substanţe specifice, denumite *opine*, care în plantele sănătoase lipsesc şi care sunt derivaţi ai aminoacizilor bazici. S-a descoperit apoi că formarea tumorilor şi sinteza opinelor este legată de prezenţa în tulpinile virulente de *Agrobacterium tumefaciens* a plasmidelor *Ti (tumor inducing)*. Faptul că aceste plasmide sunt implicate în procesul de transformare genetică la plante s-a demonstrat prin:

- toate tulpinile virulente de *Agrobacterium tumefaciens, A. rhizogenes, A. rubi* prezintă plasmide *Ti*;
- dacă bacteriile pierd aceste plasmide pierd şi capacitatea oncogenă;
- o bacterie neoncogenă care primeşte prin conjugare sau transformare genetică plasmida *Ti*, devine oncogenă.

Plasmida *Ti* face parte din categoria plasmidelor mari, având o greutate moleculară între 90 şi 182 x 10^6 daltoni. ADN-ul transformant ADN-T) conţine cca 20 kb, care alcătuiesc 7 gene. Fiind o plasmidă mare, plasmida *Ti* vector este ajustată cu ajutorul restrictazelor prin

Scanned with OKEN Scanner

eliminarea unor porţiuni, păstrându-i-se doar regiunea ADN-T şi unele secvenţe de flancare. Pentru obţinerea unei plasmide *Ti* vector au loc următoarele operaţiuni:

- se izolează regiunea ADN-T;
- se introduce ADN-T într-o plasmidă artificială, cum ar fi *pBR 322*;
- plasmida chimeră (pBR 322 + ADN-T) se clonează în bacilul colic;
- cu ajutorul unei restrictaze şi a ligazei se introduce gena pasager în cadrul segmentului ADN-T;
- se clonează apoi complexul plasmidă chimeră + gena pasager în bacilul colic;
- se introduce complexul plasmidă-genă pasager în *Agrobacterium tumefaciens* care conţine plasmide normale şi se substituie pe baza omoloagiei segmentul ADN-T propriu cu cel ce conţine gena pasager;
- se infectează plantele la care dorim să transferăm gena cu bacterii transformate genetic, sau pot fi infectate cu plasmide obţinute în culturi de celule sau de protoplaşti.

O altă plasmidă folosită în astfel de manipulări este plasmida *Ri*, specifică bacteriei *Agrobacterium rhizogenes*. Ea determină proliferarea anormală a rădăcinilor la unele dicotiledonate, fenomen denumit *„hairy roots"*. Numele ei derivă de la *„root inciting"*, este o plasmidă mare (230 kb), cu structură asemănătoare cu plasmida *Ti* şi conţine gene pentru inducerea unei rizogeneze intense.

La plante se folosesc în operaţiunile de transfer al genelor şi adenoviruşii: *caulimoviruşii* (cu ADN bicatenar) şi *geminiviruşii* (cu ADN monocatenar). Cel mai studiat în acest sens este virusul mozaicului conopidei (*CaMV*), care are formă sferică şi un ADN bicatenar a cărui greutate moleculară este de 4,5-5 Mdal. În transferul genelor la plante se mai utilizează *polietilenglicolul (PEG),* sau se speculează fenomenul de *endocitoză* (includerea genelor străine prin invaginarea membranei plasmatice la protoplaşti).

La animale, cea mai simplă metodă s-a dovedit a fi injectarea în celula ou (imediat după fecundare) a unei soluţii care conţine numeroase copii ale transgenei. Deşi se recomandă injectarea ADN-ului străin în nucleu, rezultate bune s-au obţinut şi prin includerea lui în citoplasmă,

Scanned with OKEN Scanner

caz în care trebuie asociat cu poli-lizina, care-l fereşte de degradare. În transgeneză la animale se folosesc şi virusuri. Frecvent sunt utilizaţi mutanţi ai fagului lambda, care au substituite anumite segmente cu gene străine. Vectorii derivaţi din fagul λ au fost denumiţi *fagi Charon*. În calitate de vectori de transfer la animale sunt de asemenea utilizaţi mutanţi ai virusului *SV40*, ai virusului *papiloma bovin* (*BPV*). S-au obţinut de asemenea vectori cu ADN monocatenar, plecând de la bacteriofagii M_{13},, f_2,, MS_2. În acţiunea de transgeneză la animale se folosesc şi unele retrovirusuri, ca şi vectorii rezultaţi din combinarea plasmidelor cu fagii - *cosmide*.

Alături de vectorii amintiţi, pentru transferul genelor la plante şi animale, se utilizează şi *electroporaţia, bombardarea cu microparticule, lipozomii* etc. În cazul electroporaţiei, are loc transferul de ADN străin în celule prin porii reversibili produşi de impulsurile electrice de scurtă durată, dar cu voltaj înalt (cca 2000V). ADN-ul străin poate fi inclus în celule şi prin asocierea lui la microparticule de aur, tungsten etc, constituindu-se un fel de „microproiectile" cu care sunt bombardate celulele cu ajutorul unor „puşti genice".

4.2.2. Unele realizări şi perspective ale tansgenezei la plante

Principalele etape de obţinere a plantelor modificate (transformate) genetic au fost astfel sumarizate de PFEIFFER (2003):

- izolarea genei utile (de regulă de la specii diferite de cea cultivată) şi transferul (integrarea) ei în genomul plantei de interes;
- verificarea manifestării genei transferate în celulele plantei şi regenerarea de plante fertile din celulele transformate genetic (în mod frecvent prin micropropagare);
- controlul exprimării transgenei în ţesutul potrivit şi la momentul potrivit;
- verificarea transmitrerii în descendenţă a caracterului urmărit, fapt în funcţie de care se judecă reuşita operaţiei de transformare genetică.

Exemplele de reuşită în domeniul transgenezei la plante sunt numeroase: "orezul de aur" (bogat în vitamina A), transferul rezistenţei la o serie de factori biotici şi abiotici, transferul sterilităţii, obţinerea de plante furajere cu o compoziţie ameliorată a aminoacizilor, încetinirea

Scanned with OKEN Scanner

procesului de coacere a fructelor la unele plante, transferul de gene pentru unele proteine de rezervă din seminţe etc, (PFEIFFER, 2003). În continuare vom detalia unele dintre aceste realizări.

Prin utilizarea plasmidei *Ti* (în special) la plante, au fost transferate o serie de gene la floarea soarelui, tutun, varză, sfeclă de zahăr, cartof, tomate, petunie etc. Astfel s-a transferat gena pentru *faseolină*, specifică fasolei, la floarea soarelui. Această genă a fost pusă sub controlul unor gene din plasmida *Ti:* gena pentru *octopin-sintază (OCS)* sau gena pentru *nopalin-sintază (NOS)*. Pentru identificarea ADN-ului clonat a fost utilizată gena marker *NPT II (neomicinfosfotransferaza)*, care determină rezistenţă la canamicină. Pentru transferul genei la floarea soarelui, bacterii de *Agrobacterium tumefaciens* care conţineau genele OCS-faseolină, au fost folosite la infecţia tulpinilor plantulelor de 3-5 zile sau a celulelor tulpinale cultivate *in vitro*. Unele celule şi ţesuturi de floarea soarelui transformate genetic sintetizau faseolină în cantităţi de cca 6,8-8,3 mg/gram substanţă proaspătă. Gena pentru faseolină a fost transferată ulterior şi la tutun. Au fost clonate şi transferate şi alte gene ale proteinelor de rezervă din seminţele plantelor, cum ar fi de exemplu gena *zeină*, de porumb - la floarea soarelui, gena pentru o *lectină* de soia - la tutun etc.

Procesul de transgeneză este urmărit (controlat) prin folosirea unor gene marker, care conferă rezistenţă la o serie de antibiotice ca: bleomicină, cloramfenicol, kanamicină, streptomicină, higromicină etc. Frecvent sunt folosite genele *GUS* (pentru β-glucuronidază), NPT II, *CAT* (*cloramfenicol-acetiltransferază*), *luciferază etc.*

Progrese deosebite în transgeneză la plante s-au înregistrat în direcţia transferului rezistenţei la diverşi factori de stres. S-au obţinut plante transgenice la tutun şi plop, care prezentau o rezistenţă ridicată la *glifosat*, datorită transferului genei *aroA* de la *Salmonella typhimurium*. S-au izolat plante de tutun, cartof şi tomate mai rezistente la erbicidul *fosfinotricin* prin transferul genei *bar* de la *Streptomyces hygrosopicus*. La tomate şi tutun au fost transferate de la *Bacillus thuringiensis* genele ce codifică proteinele cu efect insecticid, ce se formează în momentul sporulării bacteriei. Pentru transferul rezistenţei la unele virusuri, au fost clonate şi apoi transferate la plante genele proteinelor de înveliş (CP) ale virusurilor. În acest fel s-au obţinut primele rezultate de perspectivă pentru protecţia la unele virusuri ca: virusul mozaicului tutunului (VMT),

Scanned with OKEN Scanner

a mozaicului lucernei (VML), a mozaicului castraveților (VMC) etc, (UCHIMIYA et al., 1990). În deceniul trecut s-a reuşit în Hawai transferul genei pentru proteina de înveliş a virusului care produce pete inelare la papaia şi totodată prevenirea bolii la această specie (boală care în 1994 afecta aproape jumătate din suprafața cultivată cu papaia în Hawai), (PFEIFFER, 2003).

În ultimii 25 de ani s-au făcut progrese evidente în transgeneză la plante. Cu toate acestea, succesele sunt limitate sub aspectul transferului unor gene de mare importanță economică cum ar fi: genele pentru fixarea azotului liber, pentru diverse boli, salinitate, frig, secetă etc. În această ordine de idei, o mare realizare pentru agricultură ar fi transferul genelor „*nif*" (pentru fixarea azotului) de la bacteriile care au această proprietate, la plantele neleguminoase şi în special la cereale. Un astfel de succes ar evita pe de o parte cheltuielile imense pentru producerea îngrăşămintelor cu azot, iar pe de altă parte ar diminua evident poluarea solului cu aceste îngrăşăminte.

Capacitatea de fixare a azotului din atmosferă (*diazotropie)* este specifică unui număr mare de bacterii din genurile: *Azobacter, Klebsiella, Azomonas, Arthrobacter, Beijerinckia, Clostridium, Enterobacter, Thiobacillus, Erwinia, Desulfovibrio* etc. Se ştie de asemenea că leguminoasele sunt plante care nu au nevoie de îngrăşăminte cu azot, ele fiind capabile ca, prin simbioză cu bacteriile fixatoare de azot din genul *Rhizobium*, să-şi asigure nevoile în acest element mineral şi să contribuie totodată la îmbogățirea solului pe care vieţuiesc, cu o cantitate de cca 80-100 kg azot la hectar. Fixarea de către bacterii a azotului atmosferic se realizează prin intervenția *nitrogenazelor*, enzime care acționează la energii scăzute, sunt sensibile la oxigen şi se află sub controlul genelor „nif". În 1981 s-a constatat că acest complex enzimatic este constituit din două metaloproteide:

- *molibdoferredoxina* (sau *proteina Mo-Fe*), proteină cu greutate moleculară mare (220.000 Dal), cu structură tetramerică, având în moleculă 2 atomi de molibden şi 32 atomi de fier;
- *azoferredoxina* (sau *proteina-Fe*), cu greutate moleculară mai mică (50.000 Dal), structură chimică dimerică, având în moleculă 4 atomi de fier.

Un studiu asupra genelor „nif" de la *Klebsiella pneumoniae* a arătat că ele cuprind cca 15 cistroni. Genele „nif" se pot transfera de la o

Scanned with OKEN Scanner

bacterie la alta prin fenomenele de recombinare genetică specifice procariotelor (conjugare, transformare genetică, transducţie, sex-ducţie).În experienţele de inginerie genetică s-a reuşit transferul genelor „nif" cu ajutorul plasmidelor de la *Klebsieella pneumoniae* la bacterii înrudite, dotate cu mecanisme de protecţie împotriva oxigenului. Genele „nif" au fost transferate şi în protoplaştii drojdiei de bere, (GHIORGHIŢĂ, 1999). Se aşteaptă însă ca genele „nif" să fie transferate în genomul unor plante cultivate, sau să se reuşească sporirea numărului de plante capabile să vieţuiască în simbioză cu bacterii fixatoare de azot. Este o misiune dificilă, deoarece ea presupune transferul genelor „nif" în plasmide şi totodată reducerea tensiunii oxigenului la nivelul lor, oxigenul fiind toxic pentru nitrogeneză. Faptul că în ultimul timp s-au descoperit simbioze între plante nleguminoase şi bacterii fixatoare de azot (între specia de graminee *Digitaria decumbens* şi bacteria *Azospirillium lipoferum)* dă speranţe că problema nu e de nerezolvat.

O altă provocare pentru geneticieni o reprezintă transferul *osm-genelor* la plante şi utilizarea în acest fel a solurilor sărăturate, sau irigarea unor culturi cu apă de mare. Este un obiectiv extrem de important şi în perspectiva raţionalizării consumului de apă dulce în ţările care au mări limitrofe. La unele bacterii ca *Salmonella thyphimurium, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli* a fost identificată gena osmoreglării, (MILICĂ, 1999). Ea ar putea fi transferată la bacteriile care intră în simbioză cu plantele şi apoi la plante. Se urmăreşte de asemenea transferul osm-genelor de la plantele halofile la cele cultivate. Cercetările în acest domeniu urmăresc identificarea genelor implicate în sesizarea sărurilor în mediul de cultivare. Un exemplu îl reprezintă gena care reglează pompa de sodiu a membranei vacuolare. Plantele care reuşesc să activeze rapid această genă, când celulele sunt expuse la săruri, vor transporta sarea din citoplasmă în vacuolă, asigurând astfel detoxifierea citoplasmei.

Au fost descoperiţi factori de transcripţie care se exprimă specific când plantele sunt expuse deshidratării (gena este activată timpuriu ca răspuns la lipsa de apă, iar proteina sintetizată activează mai multe gene implicate în adaptarea la stresul hidric). Prin transferul acestei gene, s-a observat (în condiţii de laborator) că plantele modificate genetic au fost mai tolerante nu numai la deficitul hidric, ci şi la stresul salin şi la frig. S-a constatat că plantele care tolerează nivele ridicate de aluminiu solubil

Scanned with OKEN Scanner

secretă în rizosferă acizi organici. În Mexic s-au obţinut plante de papaia cărora li s-a tranferat o genă bacteriană pentru sintaza acidului citric. Plantele transgenice de papaia secretau acid citric în mediu şi rezistau la concentraţii mai ridicate de Al solubil în mediul de creştere, (CHRISPEEL şi SADAVA, 2003).

Un obiectiv important al geneticienilor şi amelioratorilor este obţinerea de genotipuri cu rezistenţă superioară la frig la diverse plante de câmp şi horticole, pentru evitarea pierderilor de recoltă provocate de îngheţurile târzii de primăvară. Aceste îngheţuri pot determina formarea în celulele mugurilor, frunzelor, florilor şi fructelor tinere, cristale de gheaţă, care străpung membranele plasmatice şi astfel distrug celulele. S-a constatat că unele impurităţi prezente în celule determină cristalizarea apei din celule la temperaturi mai ridicate decât cele obişnuite. Astfel, în prezenţa unor particule de natură minerală, apa din celule cristalizează la -8^0C, iar în prezenţa unor particule de natură organică sau a unor bacterii, la -2^0C. Unele bacterii din genurile *Pseudomonas, Erwinia, Xanthomonas* pot constitui centri de cristalizare a apei în celulele plantelor. La bacteria *Pseudomonas syringae* s-a identificat o proteină „*ina*", care se constituie în nuclee de cristalizare a apei în jurul ei şi care se află sub controlul unei gene denumită *inaZ* (*ice nucleation activity*). S-au obţinut mutanţi bacterieni pentru această genă (ina$^-$), cărora le lipseşte capacitatea de a sintetiza proteina *ina*, un fel de mutanţi antigel. Se obţin culturi cu mutanţi *ina*$^-$, cu care se stropesc unele plante agricole şi horticole (în cantităţi care depăşesc bacteriile *ina*$^-$ din plante) pentru a le proteja de îngheţurile şi brumele târzii din primăvară. Se preconizează chiar utilizarea proteinelor *ina*$^-$ ca nuclee de precipitare a vaporilor de apă din atmosferă şi provocarea de ploi artificiale, ca şi bombardarea norilor cu bacterii *ina*$^-$ pentru prevenirea grindinei, (MILICĂ, 1999).

Pentru obţinerea de plante rezistente la frig se vor identifica şi alte soluţii prin operaţiunile de transgeneză. Un exemplu îl reprezintă transferul cu ajutorul plasmidelor *Ri* a genei pentru rezistenţă la frig de la plătica de iarnă (*Pseudopleuronectes americanus)* la cartof.

Manipulările genetice asigură şi obţinerea de genotipuri de plante de cultură rezistente sau tolerante la boli şi dăunători, pentru evitarea poluării terenurilor agricole cu diverse pesticide. S-au obţinut deja prin transgeneză lini de porumb tolerante la *Helminthosporium maydis*, linii

Scanned with OKEN Scanner

de tutun rezistente la *Pseudomonas tabaci*, linii de trestie de zahăr rezistente la *Helminthosporium sacchari* şi *Cercospora sacchari,* (MILICĂ, 1999).

Culturile cu varietăţi de plante modificate genetic, în special la rapiţă, bumbac, porumb şi soia, au devenit în ultimul deceniu o realitate, ele ocupând an de an suprafeţe tot mai importante în ţări ca Argentina, Australia, Canada, China, India, Mexic şi SUA, (fig. 4.14). Se consideră că ingineria genetică va avea impact pozitiv inclusiv asupra metodelor clasice de ameliorare. Va fi posibilă, de exemplu, înlocuirea unor segmente de cromosomi de la o plantă, cu segmente (şi seturi de gene utile) de la o rudă îndepărtată, (CHRISPEELS şi SADAVA, 2003).

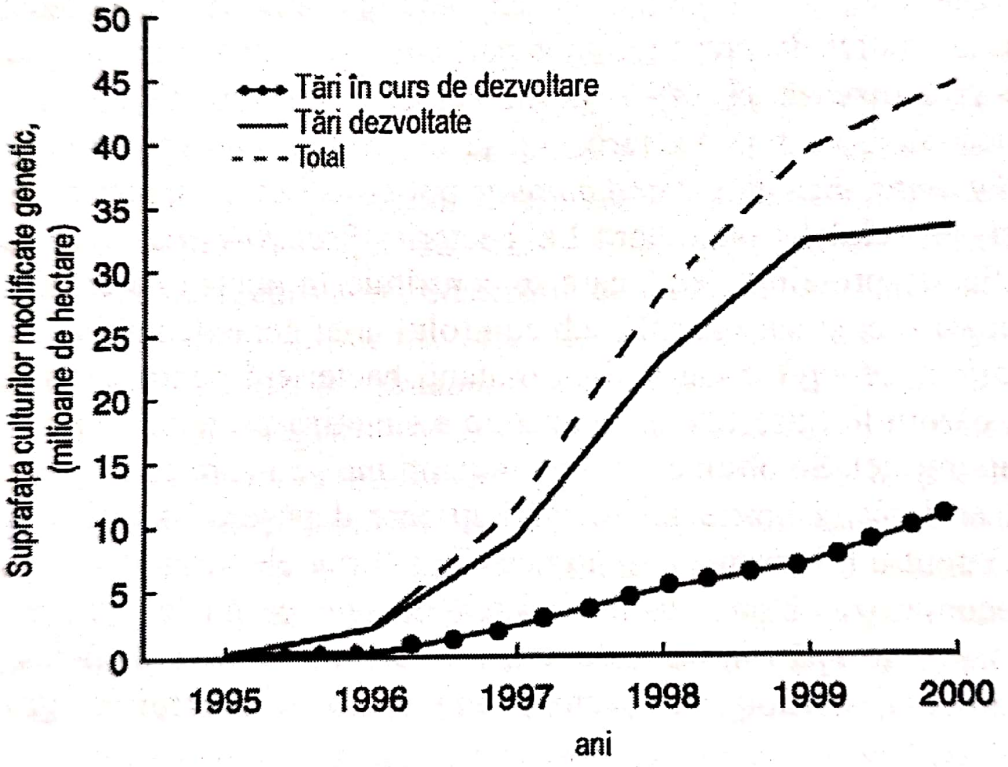


Fig. 4.14. Adoptarea culturilor GM din lumea întreagă

Experienţele de transgeneză la plante urmăresc şi obiective care par la prima vedere fanteziste, dar care pot avea un impact practic deosebit. Este vorba de obţinerea de plante furajere pentru rumegătoare, la care conţinutul în lignină să fie mai scăzut, sau de eliminarea antinutrienţilor (arabino-xilani şi glucani) din seminţele folosite ca hrană pentru animalele monogastrice. Astfel, s-a reuşit transferul la orz a unei gene fungice pentru *xilanază* care se exprimă în endospermul seminţelor

Scanned with OKEN Scanner

şi care la 37^0C a rămas activă cel puţin 6 luni, precum şi a unei gene bacteriene pentru *β-glucanază* (stabilă la căldură), care asigură o digestibilitate superioară a seminţelor de orz pentru animalele hrănite cu acestea, (HIGGINS şi CHRISPEELS, 2003).

Cercetările din domeniul biofarmaciei urmăresc producerea de către plante manipulate genetic de anticorpi monoclonali, proteine din plasma sanguină, hormoni peptidici şi citokine. OHLROGGE şi CHRISPEELS (2003) arată că în momentul de faţă cca 20 de companii din lume efectuează cercetări dedicate obţinerii de proteine umane recombinant în plante, iar sistemele biologice preconizate sunt: frunzele de tutun, endospermul seminţelor de porumb, tuberculii de cartof, tulpinile trestiei de zahăr. Un aspect luat în consideraţie de specialişti este şi cel privind izolarea plantelor care produc proteine umane în seminţe, pentru a preveni eventuala răspândire a unor gene umane prin intermediul polenului, de exemplu.

4.2.3. Unele realizări şi perspective ale transgenezei la animale

Cea mai simplă metodă de transgeneză la mamifere este injectarea genei clonate în nucleul ovulelor imediat după fecundare, zigoţii transgenici rezultaţi fiind apoi reimplantaţi în uterul femelelor gestante. Această tehnică a fost prima dată testată la şoarece de către GURDON (1980). Gena se integrează la întâmplare în cromosomii gazdei şi se va replica odată cu aceştia, astfel că toate celulele embrionului o va conţine. Primii şoareci transgenici obţinuţi purtau ADN-ul virusului SV_{40}, care a fost transferat prin microinjectare în embrioni, în stadiul de blastocist. Când în celula gazdă se transferă mai mult de o copie a trasgenei, copiile genei sunt dispuse în tandem „cap-coadă", iar integrarea genei în cromosomii gazdă nu este specifică. Dacă vectorii de clonare sunt retrovirusurile, integrarea este specifică şi este reprezentată doar de o copie a transgenei, ea fiind flancată de secvenţe lungi repetate (LTR) după integrarea în cromosomul gazdă. În acest caz, inserţia transgenei are loc în stadii embrionare mai târzii şi de aceea nu toate celulele animalului o vor conţine (aspect mozaicat).

Utilizându-se tehnica microinjectării s-au obţinut în Australia porci transgenici care produc mari cantităţi de hormon de creştere porcin. Ei sunt mai viguroşi şi mai slabi, fapt ce ar putea stârni interesul fermierilor. Prin aceeaşi metodă s-au obţinut în Canada somoni

Scanned with OKEN Scanner

transgenici pentru gena hormonului de creştere de la salmonide sau pentru gena unei proteine antigel de la cambulă, somonii obţinuţi având un ritm de creştere mai accelerat şi respectiv, o rezistenţă mai mare la frig. În SUA a fost transferată gena hormonului de creştere de la păstrăvul curcubeu - la crap, fapt ce a determinat ameliorarea creşterii acestora. Crapii transgenici au fost cultivaţi în bazine din ce în ce mai mari şi apoi într-un iaz (în condiţii strict controlate) pentru a se studia comportarea lor în competiţia cu alţi peşti, (GHIORGHIŢĂ, 1999).

Obţinerea de animale (mamifere) transgenice are perspective şi din alte raţiuni şi anume a producerii unor proteine de interes farmaceutic. Bacteriile, drojdiile, celulele vegetale manipulate genetic au limite în producerea de proteine umane funcţionale. Specialiştii s-au gândit şi la fluidul biologic care să concentreze proteinele produse prin manipulare genetică. Cel mai bun „candidat" pare a fi laptele, deoarece este bogat în proteine, lipsit de proteaze şi se secretă într-un compartiment distinct şi oarecum separat de restul organismului. În 1987, la Institutul de Fiziologie Animală din Edinburg a fost transferată gena pentru *β-lactoglobulină* de la oi la şoarece prin microinjectarea ADN-ului străin în nucleul ovocitului fecundat. S-au efectuat apoi experienţe asemănătoare şi la iepuri, porci, capre, vaci.

Recent s-au obţinut porci transgenici care secretă *fitază* în saliva lor şi care pot folosi fitaţii din furaje. Fitatul (mio-inositol hexafosfatul) asigură păstrarea fosforului în boabele de cereale şi leagă şi unele minerale esenţiale (ca zincul, fierul) pentru nutriţie, fapt ce nu permite folosirea acestor elemente de către animalele monogastrice.

Se consideră că transgeneza la animalele domestice se justifică pentru proteinele cu structură complexă, necesare în cantităţi mai mici. Prin operaţii adecvate de transgeneză se apreciază că laptele ar putea fi produsul animal care să furnizeze o serie de substanţe utile omului ca: factori de creştere şi coagulare, antigeni, enzime, anticorpi monoclonali, factori antimicrobieni etc, (GHIORGHIŢĂ, 1999).

4.2.4. Riscuri şi "legende" privind folosirea OMG

Realizările remarcabile şi promisiunile ingineriei genetice nu trebuie să abată atenţia omenirii de la riscurile pe care le implică folosirea necontrolată a acestei tehnologii. De altfel, în ultimii ani am asistat la un adevărat război al opiniei publice împotriva folosirii în agricultură a

Scanned with OKEN Scanner

organismelor modificate genetic. Sunt îndreptăţite aceste temeri şi proteste? Şi da şi nu.

Cele mai mari nelinişti sunt legate de faptul că prin practicarea tehnologiei ADN-recombinant să se obţină organisme patogene care, scăpate în natură, să provoace boli dificil de controlat sau dezechilibre ecologice majore. În laboratoarele de inginerie genetică măsurile de securitate sunt severe. Cu toate acestea, riscurile nu pot fi cu totul eliminate, mai cu seamă când se realizează manipulări genetice pe microorganisme. Să ne amintim experienţa nefericită a profesorului BEDSON de la Universitatea Birmingham, care a obţinut în secret – prin manipulări genetice, o tulpină specială de virus variolic. Unele defecţiuni ale instalaţiilor din laborator au permis accesul unor viruşi modificaţi genetic într-o încăpere alăturată, provocând decesul unei fotografe. Conştient de eroarea sa, profesorul BEDSON s-a sinucis. Incidentul era un avertisment sever privind riscurile ingineriei genetice şi a unor cercetări de acest gen în laboratoare clandestine. O eroare în manipularea unei bacterii producătoare de substanţe utile sau a unui virus folosit ca vector, ar putea determina dezechilibre majore prin eliberarea lor accidentală în mediul natural. Să ne imaginăm bunăoară consecinţele pentru învelişul verde al planetei scăparea în mediul natural al unor microorganisme modificate genetic pentru degradarea celulozei, (un proiect al bioingineriei).

Vectorii virali utilizaţi în operaţiile de transgeneză la om şi animale se produc în cantităţi mari. Obţinerea lor se realizează în celule modificate genetic - celule *de complementaţie*. Prin recombinări genetice accidentale (între materialul genetic celular şi cel viral) pot apare virusuri cu însuşiri noi, care pot infecta alte celule – *particule virale replicative* (PVR), potenţial patogene. Din acest motiv se ameliorează liniile celulare de complementaţie pentru evitarea secvenţelor omoloage de nucleotide ale acestora şi ale virusurilor. Este posibilă de asemenea contaminarea virusurilor transgenice cu virusuri sălbatice şi apariţia de recombinanţi. Se impune deci un control riguros în privinţa prezenăei particulelor infecţioase în sistemele de producere a vectorilor virali. Chiar dacă în experienţele pe maimuţe s-a observat distrugerea rapidă a PVR de către sistemul imunitar, sunt şi situaţii de imunodeficienţă, (GHIORGHIŢĂ, 1999).

Scanned with OKEN Scanner

În cazul folosirii ca vectori în transgeneză a retrovirusurilor există riscul inducerii unor forme de cancer. Inserţia întâmpătoare a unui astfel de retrovirus în vecinătatea unei oncogene sau antioncogene ar putea s-o activeze şi respectiv inactiveze, perturbând astfel mecanismul de control al proliferării şi diferenţierii celulelor. Pentru prevenirea unor accidente de acest fel pot fi inserate în vectorii retrovirali a unor gene "sinucigaşe" (cum ar fi gena *HSV* care determină sensibilitate la agentul antiviral *ganciclovir*), (SCHATZ şi LAMY, 1994).

Sunt dificil de estimat şi riscurile contaminării solului cu microorganisme modificate genetic, solul fiind un mediu populat cu diverşi microbi, în special bacterii. În mod obişnuit şi în timp populaţiile de bacterii din sol pot să se reducă şi să intre în declin, dar prin operaţii de transgeneză se poate modifica însăşi capacitatea de supravieţuire a bacteriilor. Deşi teoretic există posibilitatea ca unele bacterii din sol modificate genetic, cum ar fi specii de *Streptomyces, Rhizobium, Agrobacterium, Pseudomonas* etc, să transmită transgenele microflorei din sol sau unor plante, ea este totuşi foarte redusă. Se apreciază că natura a experimentat deja multiple recombinări genetice la microorganisme. Această problemă se pune chiar şi pentru animalele transgenice scăpate sau eliberate în mediul natural, mai ales pentru cele care au omologi în mediu, cum ar fi şoareci, şobolani, insecte, animale acvatice modificate genetic etc, situaţie în care am putea asista la răspândirea unor gene transferate în populaţiile naturale, cu riscuri imprevizibile, (GHIORGHIŢĂ, 1999).

Se studiază şi modul în care plantele transgenice pot influenţa ecosistemele în care sunt introduse, relaţiile dintre ele şi insectele polenizatoare, capacitatea lor de a prolifera şi a invada ecosistemele în dauna altor specii, posibilitatea transgenezei naturale de la o varietate la alta sau chiar la alte specii prin intermediul polenului sau a microorganismelor (bacterii, ciuperci, virusuri) care infectează plantele.

Majoritatea plantelor de cultură se propagă prin seminţe, astfel încât de regulă produsele biotehnologice obţinute de specialişti prin inginerie genetică sunt transferate către fermieri sub forma seminţelor. Pentru a exista un control asupra distribuirii seminţelor provenite de la plantele transgenice, specialiştii şi-au focalizat atenţia pe identificarea unei metode de protecţie genetică a seminţelor, pentru a le face

Scanned with OKEN Scanner

inutilizabile în acţiunea de propagare a plantelor, (pentru a preveni de fapt răspândirea seminţelor neautorizate). În acest scop, Departamentul SUA pentru Agricultură (USDA) în colaborare cu Compania Delta & Pine Land au dezvoltat un *„sistem de protecţie a tehnologiei de producere a seminţelor"*, denumit de către grupurile ce se opun culturilor transgenice *„gena terminator"*, prin care plantele sunt manipulate pentru o genă care induce inactivarea seminţelor după dezvoltarea lor completă, (după atingerea maturităţii). În principiu, acest sistem este format din:

- o *ADN-recombinază*, care recunoaşte un anumit fragment de ADN pe care îl înlătură, reunind capetele formate;
- o proteină inhibitor care poate bloca activitatea recombinazei;
- un promotor ce permite unei gene adiacente să se exprime târziu în dezvoltare;
- un fragment de ADN „de blocare" pe care îl recunoaşte recombinaza şi care este inserat între promotor şi gena letală, împiedicând-o să se manifeste;
- o genă (letală) care controlează sinteza unui produs ce omoară celula în momentul exprimării.

Pentru declanşarea sistemului se aplică seminţelor o substanţă care previne sinteza proteinei inhibitor. În acest fel recombinaza este liberă să înlăture ADN-ul de blocare şi să lege promotorul la gena letală. Seminţele tratate vor germina normal, vor forma plante care se vor dezvolta şi fructifica şi numai după dezvoltarea completă a seminţelor devine activ promotorul, care permite manifestarea genei letale şi astfel seminţele îşi pierd viabilitatea.

Acest sistem de protecţie a provocat controverse numeroase şi aprige în lume, mergând chiar până la interzicerea folosirii lui în unele ţări. S-au exprimat temeri în legătură cu stabilirea unui monopol de către companiile multinaţionale asupra varietăţilor ameliorate prin transgeneză, precum şi în legătură cu pericolul răspândirii la alte culturi a caracterului non-viabilităţii seminţelor, (BRADFORD şi BEWLEY, 2003). În ciuda protestelor, USDA şi Compania Delta & Pine continuă cercetările în acest domeniu, pentru a preveni propagarea neautorizată a varietăţilor ameliorate de plante autogame.

Din momentul apariţiei primelor organisme transgenice, controversele şi temerile şi-au făcut loc în rândul opiniei publice, dar nu

Scanned with OKEN Scanner

numai. Într-un fel e normal, pentru că aşa s-a întâmplat cu toate marile descoperiri. Au început să circule chiar unele "legende" legate de impactul organismelor transgenice asupra sănătăţii omului şi mediului. Prezentăm în continuare unele dintre acestea, după STEWART şi WHEATON (2003).

Sondaje de opinie efectuate la sfârşitul anilor 1990 arătau, de exemplu, că mulţi dintre cei chestionaţi nu ştiau că şi plantele obişnuite sunt purtătoare de gene şi nu numai cele transgenice, că în timp ce primele au 25-40 de mii de gene, cele transgenice au în plus doar 1-3 gene. Un semnal de alarmă s-a tras la un moment dat în legătură cu pericolul în care s-ar afla în privinţa supravieţuirii fluturelui monarh (*Danaus plexipus*) odată cu promovarea în cultură a porumbului Bt în SUA. Unele cercetări efectuate de J. LOSEY et al. au dus la concluzia că polenul de porumb Bt s-ar depune pe frunzele plantelor de *Asclepias syriaca* aflate în preajma lanurilor de porumb şi ar provoca moartea larvelor fluturelui monarh care se hrăneşte cu aceste frunze. Studii extinse efectuate ulterior de M. SEARS et. al. pentru verificarea rezultatelor prezentate anterior nu au confirmat legătura şi au ajuns la concluzia că impactul porumbului Bt asupra fluturelui monarh este probabil redus.

Un alt mit care s-a răspândit odată cu introducerea în cultură a plantelor MG a fost acela că ele vor duce la apariţia de superburuieni, adică a unor burueni mai invazive şi mai periculoase decât cele obişnuite. Sub acest aspect, temerile nu sunt chiar nejustificate. Se pune problema plantelor cultivate cărora li s-au transferat gene de toleranţă la erbicide, gene care ar putea trece la burueni înrudite. Se ştie bunăoară că, după o perioadă îndelungată de folosire a erbicidelor, s-au selectat pe cale naturală unele burueni care tolerează erbicidele. Deocamdată nu există burueni MG, dar nu se ştie cum vor sta lucrurile peste ani. Riscurile nu sunt de neglijat pentru unele culturi cum ar fi porumbul, napul, bumbacul orezul, care au în natură rude sălbatice. Evident că în astfel de situaţii culturile transgenice trebuie realizate în zone unde nu sunt prezente plante sălbatice înrudite.

Sunt discuţii şi în legătură cu natura plantelor de cultură "dotate" cu unele gene de interes de la animale. În momentul de faţă există salată care conţine gene de şobolan, tomate cu gene de peşti, sau plante cu gene de porc. Desigur că aceste gene nu schimbă natura plantelor, ci

Scanned with OKEN Scanner

doar răspund unor interese economice. Mai mult, nu întotdeauna transferul unor astfel de gene asigură efectul scontat. Aşa de exemplu, transferul la tomate a unei gene antigel de la peştii arctici nu şi-a atins ţinta, în sensul că plantele transgenice de tomate nu s-au dovedit rezistente la ger. Evident că sosul de tomate din aceste plante nu se deosebeşte de cel obţinut din plantele obişnuite. Totodată, nici ideea că produsele oferite de plantele dotate cu gene de la organisme îndepărtate genetic nu ar fi naturale. Şi în natură sunt exemple de acest gen. Să ne gândim bunăoară la boala crown-gall, în care un segment de ADN bacterian este încorporat în ADN-ul plantei. Tot atât de "nenaturale" sunt şi cele cca 2000 de varietăţi de plante obţinute prin mutageneză experimentală, care sunt cultivate în diverse regiuni ale lumii (STEWART şi WHEATON, 2003), după cum numeroase gene au fost achiziţionate de către plantele de cultură de la rudele lor sălbatice prin încrucişări back-cross. Totodată, genomurile plantelor nu sunt atât de stabile cum se credea acum mai bine de două decenii, prezenţa (şi activarea) transpozonilor putând determina importante tulburări în genom (duplicaţii ale genelor, rearajări ale acestora etc), cu efecte imprevizibile asupra unor caractere.

Există un conflict între, să-i spunem agricultura tradiţională – ameliorată prin metodele clasice, şi cea prin transgeneză. Corporaţiile mari de producere şi livrare a seminţelor către fermieri încearcă să acrediteze ideea în opinia publică că alimentele MG sunt nesigure, pentru a-i îndepărta pe consumatori de acestea şi a-şi spori astfel veniturile. La rândul lor şi marile companii biotehnologice îşi apără interesele lor economice, întrucât au investit miliarde de dolari în obţinerea şi producerea de culturi MG, mai cu seamă că avantajele folosirii acestora nu pot fi ignorate. Aceste companii au proiecte importante privind promovarea culturilor MG, de tipul "orezului de aur", a cartofului şi catofului dulce - rezistente la virusuri etc, în ţările în curs de dezvoltare, fiind create deja unele condiţii ca acţiunea să reuşească, având în vedere că o serie de tineri din aceste ţări şi-au desăvârşit formarea profesională în ţări ca SUA, Australia, Japonia, Europa Occidentală.

O altă temere legată de promovarea culturilor MG la plante este aceea că prin OMG s-ar produce transferul pe orizontală a unor gene la microorganisme şi că astfel se vor crea probleme de rezistenţă la unele

Scanned with OKEN Scanner

antibiotice pentru om şi animale. Se ştie faptul că selecţia plantelor transformate genetic se face folosindu-se ca marker rezistenţa la antibiotice. Se ştie de asemnea că genele se pot transfera între bacterii prin diverse modalităţi şi chiar la unele plante cu ajutorul bacteriei *Agrobacterium tumefaciens*. Specialiştii consideră că probabilitatea ca unele gene de la plante să se transfere la bacterii este foarte mică, dacă nu chiar imposibilă şi pentru faptul că genele la plante au aspect mozaicat (conţin introni), în timp ce la bacterii nu. Pentru a elimina şi aceste nelinişti, companiile biotehnologice au adoptat tehnologii pentru înlăturarea genelor de rezistenţă la antibiotice după confirmarea reuşitei acţiunii de transformare genetică a plantelor, astfel încât ele să nu mai conţină aceste gene în momentul livrării către fermieri.

Nici opinia că atât culturile, cât şi alimentele MG, nu ar fi testate şi reglementate suficient nu este corectă. În SUA, de exemplu, în acest proces sunt implicate 3 organisme naţionale: Departamentul pentru Agricultură, Agenţia de Protecţie a Mediului şi Administraţia pentru Alimente şi Droguri. În momentul aprobării unui OMG sau produs OMG, cantitatea de informaţii furnizate este imensă, se fac zeci de mii de analize, teste în câmp şi teste de siguranţă alimentară (pe animale). Astfel, pentru aprobarea culturilor de soia rezistente la erbicide au fost antrenate 31 de agenţii de profil din 17 ţări, (STEWART şi WHEATON, 2003).

Orice tehnologie nouă prezintă însă riscuri, mai mari sau mai mici. Uneori suntem obligaţi să alegem între aceste riscuri. În privinţa plantelor MG, riscurile sunt încadrate în două categorii: riscuri de securitate alimentară (care se referă la caracterul alergenic şi toxicitatea proteinelor) şi riscuri ecologice (legate de managementul rezistenţei la toxinele produse de plante, transferul genelor la alte specii de plante, alte efecte decât cele ţintite). Este un lucru cert că utilizarea plantelor MG aduc beneficii substanţiale atât companiilor biotehnologice, cât şi fermierilor. A trecut totuşi prea puţin timp de la primele reuşite în domeniul transgenezei şi de la comercializarea primelor culturi de plante MG pentru a ne pronunţa asupra riscurilor pe termen lung al acestora.

Scanned with OKEN Scanner

4.3. Clonarea la animale şi perspectivele ei

Data de 5 iulie 1996 va rămâne înscrisă în istoria ştiinţei ca una de referinţă, fiind momentul în care s-a anunţat obţinerea prin *clonare somatică* a primului animal superior (un mamifer) – celebra oiţă Dolly.

Ce se înţelege prin termenul clonare? Clonarea este fenomenul de obţinere pe cale asexuată a unor celule sau organisme care au aceeaşi constituţie genetică. Clonele reprezintă deci copii rezultate dintr-o singură celulă diploidă sau dintr-un singur individ. Pentru a înţelege acest termen, facem trimitere la înmulţirea pe cale vegetativă (bulbi, tuberculi, butaşi etc) a unor plante superioare, în care se obţin organisme asemănătoare din punct de vedere genetic şi care în consecinţă au aceleaşi particularităţi morfo-fiziologice, aceleaşi cerinţe faţa de climă şi sol, aceeaşi rezistenţă la condiţiile de mediu, aceeaşi productivitate etc.

Termenul clonă a fost introdus în 1903 de botanistul WEBBER, prin care înţelegea plante tinere obţinute pe cale asexuată. Ulterior, odată cu succesele înregistrate în domeniul culturilor de celule vegetale, animale şi bacteriene, prin clonă s-au definit celulele ce derivă prin diviziuni succesive dintr-o celulă unică, (DONNARS et al., 2005), iar după 1970 – odată cu succesele înregistrate în domeniul ingineriei genetice, termenul s-a extins şi la gene (clonarea genelor) - la multiplicarea lor prin intermediul bacteriilor sau levurillor.

În cazul animalelor, clonarea este o operaţie mai complicată şi constă în transferul nucleului unei celule embrionare sau somatice într-o ovocită secundară enucleată, (fig. 4.15). Clonarea la animale poate fi de două tipuri: *embrionară*, caz în care nucleul transferat provine de la celule embrionare şi *somatică*, situaţie în care nucleul transferat aparţine unei celule somatice (unei celule diferenţiate a organismului ce urmează să fie clonat).

Primele operaţiuni reuşite de clonare la animale s-au efectuat cu mult înainte de 1996, având însă ca "subiecţi" broaştele (*Rana pipiens* şi *Xenopus laevis*). De ce broaştele? Pentru că acestea depun ouă din abundenţă, ovocitele de broască sunt de mari dimensiuni şi pot fi mai uşor de manipulat, dezvoltarea ouălor de broască poate fi observată cu uşurinţă, creşterea embrionilor de broască nu ridică probleme etc (CÎRLAN, 2001).

Scanned with OKEN Scanner

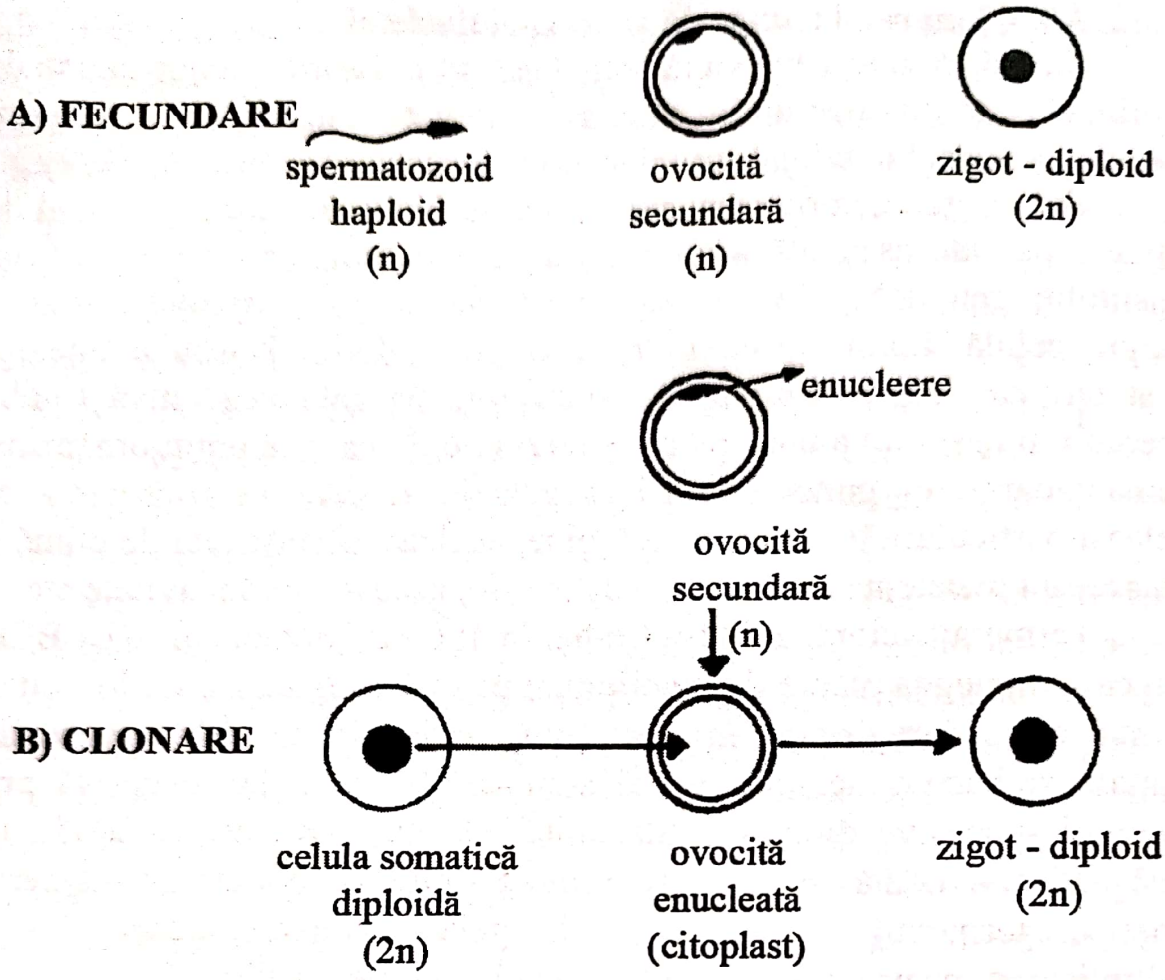


Fig. 4.15. Comparația între fecundarea clasică şi clonare (după CIRLAN, 2001)

În 1952 BRIGGS şi KING reuşeau să cloneze broaşte din ovocite enucleate în care transferau nuclei de la embrionii aflați în stadiul de blastulă. Un succes asemănător a fost anunțat în 1962 de către GURDON, care reuşea clonarea somatică la *Xenopus laevis* (prin transferul în ovocitele enucleate a nucleilor din celulele epiteliului intestinal), broaştele obținute fiind capabile ca la maturitate să dea descendenți normali.

Mamiferele au făcut obiectul clonărilor pe la începutul anilor 1980, când ILLMENSEE şi HOPE anunțau reuşita unor clonări la şoarece prin utilizarea embrionilor în stadiul de blastocist. În aceeaşi perioadă s-au anunțat succese asemănătoare la bovine: prin secționarea în două a embrionilor în stadiul de blastocist şi plasarea acestora în uterul unor vaci diferite; prin recoltarea de ovocite din ovarele vacilor sacrificate în abatoare, maturarea lor *in vitro* până la stadiul de metafază II, enucleerea, preactivarea acestora şi fuziunea citoplastelor obținute cu

Scanned with OKEN Scanner

embrioni aflaţi în stadiul de blastocist, (POSTEL-VINAY, 1997). Existau în acea perioadă şi opinii că la mamifere clonarea ar fi imposibilă, fapt infirmat după mai bine de 1 deceniu.

4.3.1. Clonarea embrionară

Acest tip de clonare se bazează pe *totipotenţa* celulelor rezultate din diviziunea zigotului până în stadiul de *morulă* (8 – 64 blastomere) şi a celor provenite din masa celulară internă în stadiul de *blastocist* (124 blastomere), denumite *celule stem embrionare* (*ES*). Totipotenţa reprezintă capacitatea acestor celule de a se comporta întocmai ca zigotul dacă sunt separate, (adică de a genera fiecare indivizi de sine-stătători, perfect normali şi identici genetic). In ultimul timp sunt folosite mai larg ca celule donatoare de nuclei celulele ES, deoarece pot fi conservate în azot lichid şi utilizate la nevoie, pot fi cultivate timp nelimitat fără pierderea totipotenţei etc.

În acţiunea de clonare a embrionilor de mamifere se parcurg o serie de etape care urmăresc pregătirea embrionilor donatori de nuclei şi a ovocitelor receptoare a acestora, transferul de nuclei şi cultivarea embrionilor rezultaţi înaintea implantării şi apoi transferul lor în uterul *mamelor surogat* (femelele în uterul cărorar se vor dezvolta clonele) etc. Se pregătesc pentru implantare mamele surogat, în sensul că prin anumite tratamente hormonale se aduc în acelaşi moment în faza de estrus şi de ovulaţie, propice implantării embrionilor clonaţi (aflaţi în stadiul de blastocist) şi asigurării condiţiilor de continuare a dezvoltării acestora.

Pentru obţinerea embrionilor donatori de nuclei se recoltează din oviductele femelelor performante (prin laparatomie) ovocitele secundare, care se cultivă apoi *in vitro* timp de cca 22 ore, sunt fecundate cu spermatozoizi (conservaţi prin congelare şi proveniţi de la masculi cu calităţi de producţie deosebite), zigoţii obţinuţi sunt cultivaţi *in vitro* cca 4-6 zile – perioadă în care embrionii ating stadiul de morulă compactă (32 – 64 blastomere). Totodată, ovocitele receptoare recoltate din ovarele femelelor sacrificate în abatoare, sunt cultivate *in vitro* până în stadiul de metafază II (cca 24 de ore), după care li se înlătură (prin aspirare cu o micropipetă) materialul nuclear împreună cu citoplasma din proximitate (placa metafazică). Citoplastele astfel obţinute sunt cultivate *in vitro* cca 18 – 20 ore după care, cu ajutorul unei micropipete, li se transferă

Scanned with OKEN Scanner

nucleul (de fapt o blastomeră smulsă din embrionul donator) în spațiul lor perivitelin (prin străpungerea pellucidei). Prin intervenția cu șocuri electrice (cca 1,2 kV/cm) scurte (cca 30 microsecunde) se realizează fuziunea membranei ovocitei cu cea a blastomerei. Zigoții astfel obținuți se dezvoltă până la stadiul de blastocişti, fie prin cultivare *in vitro* (cca 6 – 7 zile), fie prin transferul lor în oviductele ligaturate ale unor femele. Blastociştii viabili sunt apoi transferați în coarnele uterine ale mamelor surogat pregătite în acest scop pentru continuarea şi finalizarea embriogenezei, (CÎRLAN, 2001). Pentru multiplicarea unui genotip valoros se poate recurge la clonarea embrionară în serie (clonarea clonelor), caz în care generația de embrioni rezultată din primul transfer de nuclei (blastomere) serveşte ca sursă de nuclei pentru o nouă generație, sau se foloseşte o linie de celule ES stabilizată ca donatoare de nuclei, (fig. 4.16). Protocolul descris mai sus este folosit la bovine, dar în linii mari este valabil şi pentru alte specii de mamifere.

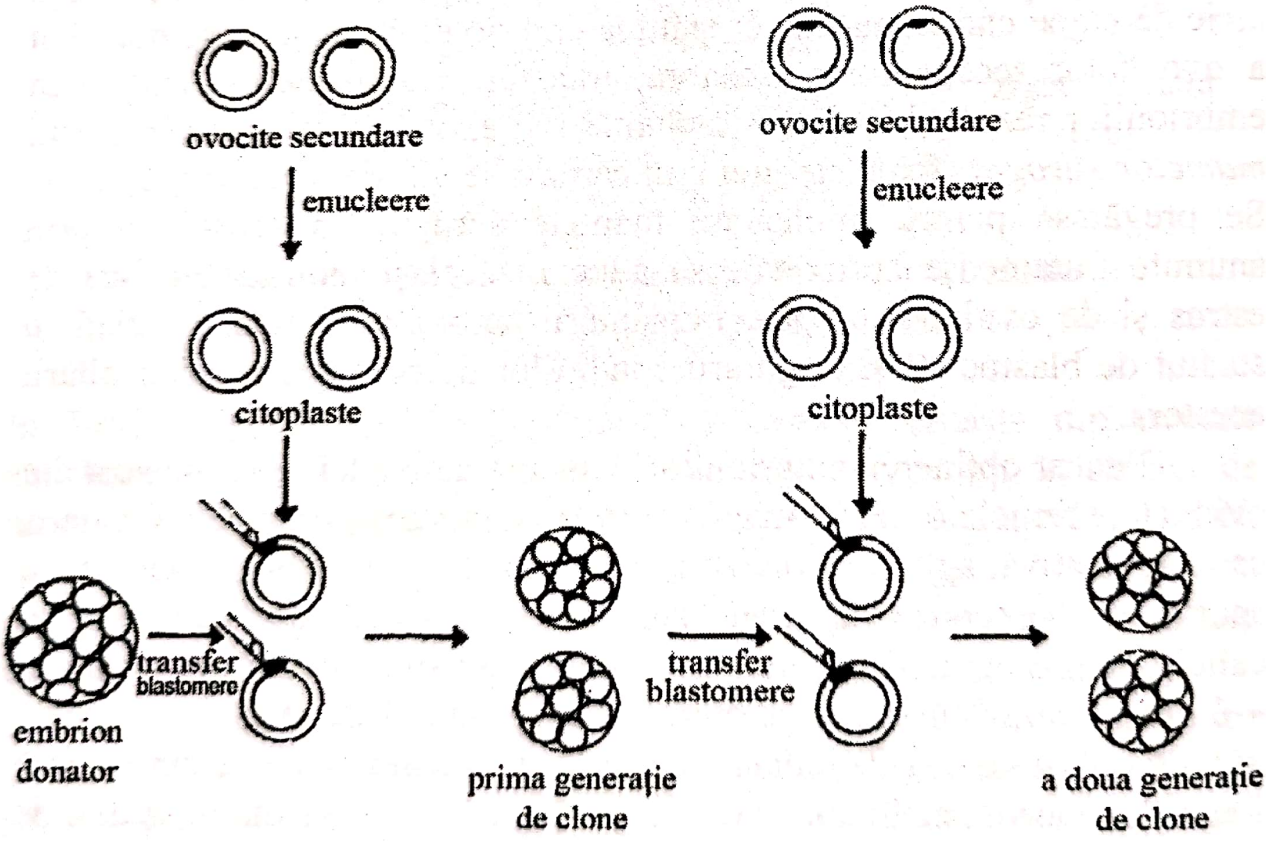


Fig. 4.16. Clonarea embrionară seriată cu două generații de clone (după CÎRLAN, 2001)

Scanned with OKEN Scanner

Clonarea embrionară a fost practicată cu succes din anii 1980 şi până în prezent la vaci, iepuri, capre, porci şi maimuțele *Rhesus*. La cele din urmă, de exemplu, din 101 zigoți obținuți prin tehnica prezentată anterior, doar 53 au fost capabili să se dezvolte în continuare, şi prin transferul lor în uterul a 17 mame surogat, doar două sarcini s-au finalizat. O eficiență sporită a arătat clonarea în serie, care a atins cifra de 30 clone la şoareci, de 10 - la vaci şi de 45 - la capre. S-a constatat totuşi şi în acest din urmă caz că randamentul clonării în serie scade cu numărul generațiilor de clonare, (CÎRLAN, 2001).

Clonarea embrionară are dezavantajul că, deşi clonele obținute au genotipuri identice, însuşirile lor morfo-fiziologice nu pot fi cunoscute din start, ci doar când animalele ating maturitatea (de abia atunci vom afla cum arată clona), pentru că zigoții şi apoi embrionii donatori de nuclei sunt practic rezultatul unei fecundări obişnuite, care se realizează însă *in vitro*. Acest inconvenient se evită în cazul clonării somatice, situație în care celulele donatoare de nuclei sunt celule somatice prelevate de la animale adulte, ale căror însuşiri morfo-fiziologice sunt cunoscute şi prin clonare se asigură doar reproducerea lor. De fapt acestea sunt adevăratele clone şi de aceea prima operațiune reuşită de clonare este considerată cea realizată în 1996 de echipa condusă de IAN WILMUT la Institutul Roslin din Scoția.

4.3.2. Clonarea somatică

Deşi experiențe de clonare, în care se utilizase nuclei prelevați de la celule fetale diferențiate, reuşiseră la *Xenopus laevis*, până la succesul cu oița *Dolly* au existat opinii că acest tip de clonare nu e posibil la mamifere, pentru că încercările de acest gen suferiseră eşecuri.

Prin ce se deosebeşte tehnica folosită de cercetătorii scoțieni conduşi de IAN WILMUT (fig. 4.17) de cele prezentate anterior şi cum de au reuşit ei acolo unde alții eşuaseră? Tehnica lor a fost în linii mari asemănătoare cu cea descrisă la clonarea embrionară, căreia i s-au adus însă unele corective (inovații), după cum vom arăta în continuare.

În acest caz au fost fuzionate ovocite secundare enucleate de la un grup de oi din rasa *Scottish Blackface* (oi cu capul negru) cu celule din epiteliul glandei mamare de la o oaie gestantă (în ultima lună) din rasa *Finn Dorset* (cu blana albă).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 4.17. Ian Wilmut, şeful echipei scoţiene care a realizat prima clonare somatică reuşită (stânga) şi mieluţa *Dolly* împreună cu mama purtătoare (dreaptă)

Numai era vorba deci de celule embrionare, ci de celule specializate care furnizau materialul nuclear. Oile de la care s-au recoltat ovocitele au fost tratate cu hormoni (pentru sincronizarea estrului şi inducerea superovulaţiei), după 28 – 33 ore de la administrarea hormonilor s-au prelevat 434 ovocite secundare. Ovocitele au fost recoltate (chirurgical) în metafaza a II-a (fază în care se găsesc în mod normal în momentul ovulaţiei), au fost enucleate prin aspiraţia plăcii metafazice şi citoplasmei aderente, după care citoplastele obţinute au fost cultivate *in vitro* (pentru maturare) pe un mediu de cultură adecvat, la temperatura de 37° C, (fig. 4.18).

Tehnica scoţienilor, cum arătam anterior, aducea unele inovaţii. Una dintre ele a constat în aceea că celulele prelevate din glanda mamară erau cultivate *in vitro* pe un mediu nutritiv sărăcit în ser fetal de viţel (de la concentraţia de 10%, la 0,5%), fapt ce aducea celulele în stadiul G_o (o stare de cvasihibernare). Până la reuşita echipei scoţiene, cercetătorii aveau mari dificultăţi în sincronizarea ciclurilor mitotice ale celulelor donor şi receptor. Celulele embrionare folosite anterior în transferul nuclear se aflau în fazele G_2 sau S şi din acest motiv, în momentul fuziunii, avea loc o replicare suplimentară a ADN, fapt ce antrena o serie de anomalii cromosomiale, datorită unor concentarţii mari de *MPF* (*maturation promoting factor* – factorul de promovare a maturării). Acest MPF este un complex format dintr-o kinază dependentă de cicline (cdk_1) şi din ciclina B, reprezintă iniţiatorul diviziunii celulare, se sintetizează

Scanned with OKEN Scanner

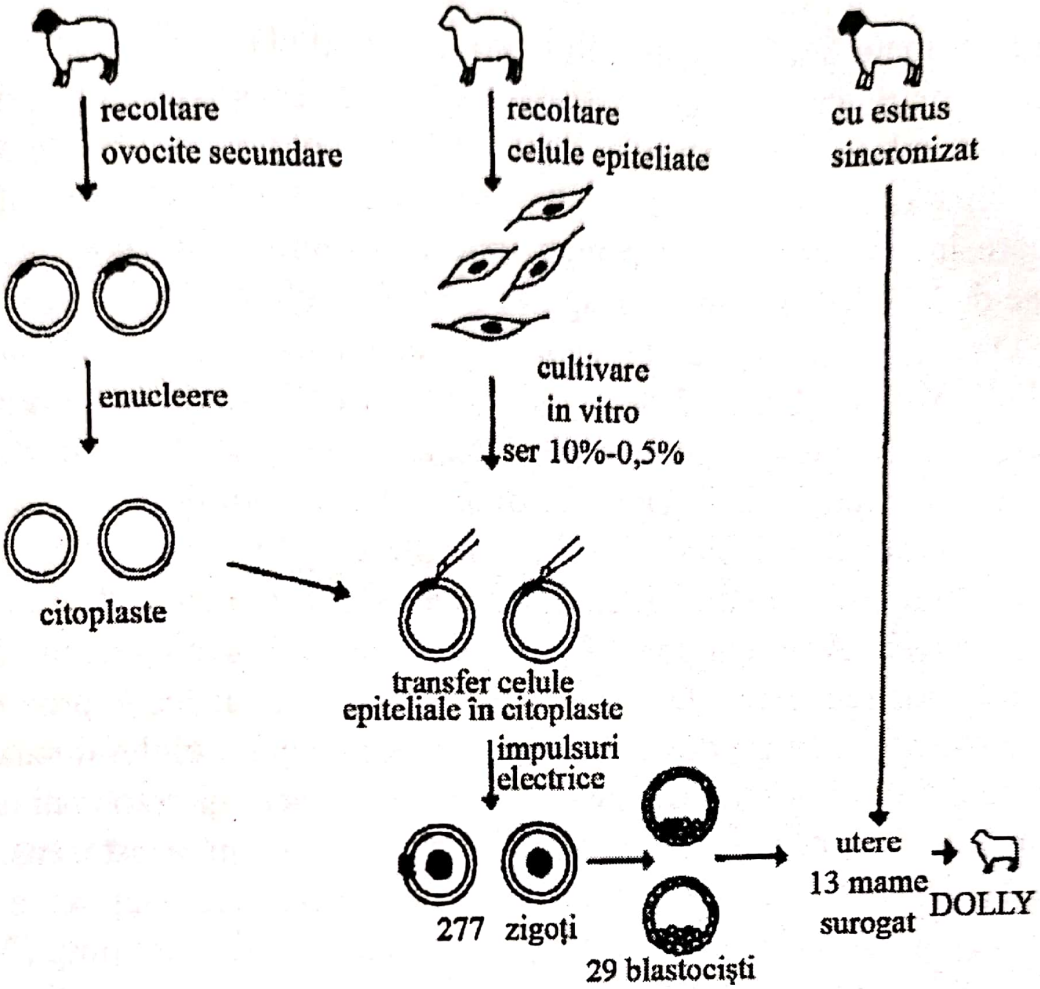


Fig. 4.18. Tehnica folosită de I.WILMUT în clonarea lui Dolly (după CÎRLAN, 2001)

în G_2, atinge valori maxime până în metafază şi se degradează în anafază. Concentraţiile mari de MPF determină ruperea membranei nucleare şi permite intrarea ADN-ului nuclear în contact cu un factor citoplasmatic, care va determina o nouă replicare a lui. Acest inconvenient a fot depăşit de echipa scoţiană prin aducerea celulelor donatoare într-o stare de hibernare (G_o), prin cultivarea lor pe un mediu nutritiv care conţinea doar săruri minerale, factori de creştere şi puţin ser fetal, pentru a li se asigura doar supravieţuirea şi a evita acumularea MPF. S-a renunţat totodată la prelevarea nucleilor din celulele donatoare şi transferul lor în ovocitele enucleate, deoarece operaţiunile de recoltare a nucleilor produceau leziuni membranelor lor şi s-a optat pentru varianta transferului în ovocitele enucleate a celulelor somatice întregi. Inaintea acestui transfer autorii au preactivat ovocitele printr-un impuls electric (care determină eliberarea calciului intracelular), acţiune care asigură păstrarea învelişului nucleului celulei donatoare în momentul fuziunii. Cu ajutorul

Scanned with OKEN Scanner

unei micropipete s-a introdus celula somatică aflată în G_o a epiteliului glandei mamare în zona perivitelină a ovocitei enucleate, iar fuziunea celor două celule s-a realizat tot cu ajutorul unor impulsuri electrice. Preactivarea ovocitului anucleat şi oprirea ciclului mitotic la celulele donatoare în stadiul G_o sunt principalele contribuţii tehnice ale echipei conduse de WILMUT, care au asigurat succesul acţiunii de clonare.

Din cele 434 de ovocite secundare recoltate 157 nu au fuzionat cu celulele donatoare. Cei 277 de zigoţi somatici obţinuţi au fost plasaţi în oviductele ligaturate ale unor oi din rasa *Scottish Blackface*, iar după 6 zile au fost recuperaţi 247. Doar 29 dintre aceştia s-au dezvoltat până la stadiul de blastocist, ei fiind transferaţi în uterul a 13 oi purtătoare şi din cei 29 de embrioni somatici doar unul singur s-a dezvoltat perfect normal – mieluţa *Dolly*. Amprentarea ADN-ului acesteia a arătat că genomul lui *Dolly* este identic celui de la oaia *Fin Dorset*, de la care proveneau celulele somatice. Era o dovadă a faptului că nucleul celulei donatoare, în prezenţa factorilor citoplasmatici din ovocit, funcţiona întocmai ca cel rezultat din fuziunea gameţilor, celule specializate în acest sens. S-a constatat de asemenea că funcţia de reproducere a clonei nu a fost afectată, oaia Dolly dând descendenţi normali şi viabili. Intre timp (2003) oaia Dolly a murit, fapt care poate fi privit ca un argument în favoarea uneia din consecinţele presupuse ale clonării – o durată mai scurtă a vieţii decât la o oaie obişnuită.

Deşi iniţial au fost rezerve şi îndoieli în privinţa succesului echipei scoţiene, ulterior au fost raportate noi şi noi reuşite de clonare somatică la mamifere, în care s-au folosit ca donatoare de nuclei celule din diverse ţesuturi somatice, cum ar fi cele obţinute de WAKAYAMA et al. (1998), TSUNODA et al. (1998) la şoarece, de Kato et al. (1998) şi WELLS et al. (1999) la vacă, de BAGUISI et al. (1999) la capră de ONISHI et al. şi POLEJAEVA et al. (2000) la porc etc, (citaţi după CÎRLAN, 2001). Reuşita unor experienţe de clonare până la diverse stadii de dezvoltare a clonei, ba chiar până la cel final, a fost anunţată şi la om, deşi lipsesc dovezile certe în acest sens. Acum nimeni nu se mai îndoieşte de faptul că acţiunea poate să reuşească şi la om, dovadă interdicţia de practicare a clonării la om luată într-o serie de ţări.

În ciuda succeselor enumerate mai sus, sunt încă multe aspecte de elucidat, sunt necesare în continuare perfecţionări ale tehnologiei de clonare somatică pentru a deveni economic rentabilă. În cazul *Dolly*

Scanned with OKEN Scanner

randamentul clonării a fost foarte scăzut, de doar 3,4% dacă raportarea se face la numărul de blastocişti implantaţi la mamele surogat (1 produs viu/29 blastocişti) şi de 0,4% dacă raportarea se face la numărul de zigoţi somatici (1/277). În alte experienţe de clonare s-au obţinut randamente şi mai scăzute, cum ar fi de un 1/717 embrioni la şoarece, dar şi mai ridicate (mai ales la bovine şi ovine), care nu depăşesc totuşi 10 – 11 %. S-a constatat de altfel că unele fibroblaste se pretează mai bine la clonare decât altele, precum şi unele animale comparativ cu altele (ovinele şi bovinele se clonează mai uşor decât şoarecii, de exemplu), dar nu se ştie de ce. La bovine cca 40-50% din embrionii clonaţi ating stadiul de blastocist, iar din cei transplantaţi la receptori doar cca 20% ajung la stadiul de 3 luni şi din aceştia doar 10% ating stadiul de naştere, (DONNARS et al., 2005). Se pare că randamentul clonării depinde de numeroşi factori, printre care enumerăm: sursa de ovocite şi calitatea lor, ţesutul din care sunt prelevate celulele donatoare de nuclei, ineficienţa metodelor de preactivare a ovocitelor, reprogramarea neadecvată a nucleilor transferaţi etc.

După părerea unor autori, eficienţa scăzută a clonării şi apariţia de malformaţii la clone sunt fenomene datorate erorilor în reprogramarea materialului genetic din embrionii clonaţi. Nucleul unei celule diferenţiate folosit în clonare trebuie reprogramat, trebuie "să-şi uite trecutul", aşa cum foarte plastic se exprima BLOND (2002). ADN-ul unei astfel de celule este puternic metilat, iar reactivarea genelor la o celulă adultă presupune schimbarea gradului de metilare a ADN-ului ei. Metilarea reprezintă o modificare epigenetică reversibilă. Demetilarea ADN-ului la clone este în majoritatea cazurilor incompletă, eronată şi de aici o serie de consecinţe (dereglarea expresiei unor gene). Sunt păreri că în reuşita clonării poate fi implicată şi modificarea gradului de acetilare a histonelor, sau perturbarea unor factori citoplasmatici în momentul transferului în ovocitul anucleat al nucleului celulei somatice.

4.3.3 Riscurile clonării somatice

Cum arătam mai sus rata succesului în cazul clonării somatice este redusă şi aceasta datorită unor tulburări ale dezvoltării embrionilor somatici clonaţi, care duc la avorturi şi la o mortalitate ridicată a nou-născuţilor. S-au observat la clonele de ovine tulburări ale funcţiei renale, la taurine modificări ale aparatului cardio-vascular, deficienţe de

Scanned with OKEN Scanner

imunitate. Cea mai frecventă anomalie evidențiată la ovine şi taurine *este sindromul produşilor voluminoşi,* care constă în creşterea semnificativă a greutății corporale a fetuşilor (dar nu şi a placentei) şi nou-născuților, (CÎRLAN, 2001; DONNARS et al., 2005). Nu se ştie exact cauza fenomenului (se presupune că e legat de cultivarea *in vitro* a zigoților somatici), dar el este urmat de prelungirea perioadei de gestație, necesitatea practicării operației de cezariană la fătare pentru salvarea feților, modificarea fibrelor musculare şi creşterea evidentă a cantității de insulină la nou-născuți etc. Deşi problema este încă în discuție, se consideră că rata redusă de supraviețuire a embrionilor somatici s-ar putea datora şi heteroplasmiei mitocondriale, pentru că analiza ADN-ului mitocondrial la clonele somatice obținute a arătat că în unele cazuri (inclusiv la oița Dolly) el este specific ovocitei receptoare (homoplasmie mitocondrială), în alte cazuri (la viteii clonați) el este de două tipuri (unul specific ovocitei şi celălat celulei donatoare de nucleu).

Sunt discuții aprinse şi în privința vârstei biologice a clonelor somatice şi implicit a duratei lor de viață. Care este de fapt vârsta clonei: cea a unui organism reprodus pe cale sexuată, sau a organismului clonat (furnizorul de nuclei somatici)? Au organismele clonate o durată mai mică de viață comparativ cu cele reproduse sexuat? Ca oricare alt caracter, se pare că şi durata vieții (vârsta maximă) a unui organism este determinată genetic. Aşa se face că în lumea eucariotelor durata vieții se poate număra uneori în zile şi ani, alteori în sute şi chiar mii de ani. Desigur că, în funcție de condițiile de viață, de starea de sănătate etc, şi în acest caz vârsta maximă poate fi atinsă sau nu şi de aceea se discută mai mult despre durata medie de viață. In ultimă instanță şi acest fenotip (durata de viață) este un rezultat al relației genotip/condițiile de mediu (de viață).

În ultimul timp este tot mai mult invocată lungimea *telomerelor* (extremitățile cromosomilor, care au o structură specială şi care împiedică cromosomii să se unească între ei) ca fiind un indicator al vârstei unui organism, pe măsura succesiunii diviziunilor celulare şi a înaintării în vârstă a organismului ele scurtându-se. Această legătură a fost prima dată făcută de H. COOKE în 1986, care constata că lungimea telomerelor cromosomilor sexuali umani era mai mare în celulele germinale decât în celulele somatice (telomerele umane se scurtează cu cca 100 perechi de baze per diviziune celulară). S-a observat apoi în

Scanned with OKEN Scanner

culturi de celule *in vitro* că, cu cât aceste telomere sunt mai lungi cu atât celulele se divid de un număr mai mare de ori. Integritatea telomerelor este asigurată de *telomerază*. Activitatea ei este foarte intensă în spermatogonii, absentă în spermatocite, spermatozoizi şi în ovocitele fecundate, se reactivează imediat după fecundare şi creşte până în stadiul de blastocist, după care scade şi încetează în stadiul embrionar. Existenţa "orologiului telomeric" a fost confirmată şi în studiile comparative pe culturi de celule umane normale şi tumorale, în sensul că la primele, după un număr definit de diviziuni se produce erodarea telomerelor şi celulele încetează să se mai dividă, în timp ce celulele canceroase îşi păstrează telomerele nealterate şi se divid nedefinit, (DE LANGE, 1999). Se pare că în celulele canceroase se reactivează telomeraza. Lungimea telomerelor este o caracteristică de specie şi relaţia ei cu vârsta trebuie privită doar în interiorul unei specii şi nu între specii diferite. Bunăoară, la şoarece telomerele sunt de 3 ori mai lungi ca la om, ceea ce nu înseamnă că şoarecii trăiesc de 3 ori mai mult ca oamenii.

În cazul *Dolly* s-a confirmat legătura între lungimea telomerelor şi vârsta ei biologică, în sensul că lungimea telomerelor cromosomilor ei somatici la vârsta de 1 an era mai mică decât a oilor de aceeaşi vârstă reproduse sexuat (19,4 kb, faţă de 23,9 kb) şi corespunzătoare vârstei de 6 ani a celulelor donatoare din epiteliul glandei mamare (la 1 an *Dolly* avea deci vârsta de 6 ani). In alte experienţe reuşite de clonare relaţia nu s-a confirmat. La bovine s-a constatat că în unele situaţii lungimea telomerelor la viţeii clonaţi somatic nu diferă de a celor de aceeaşi vârstă reproduşi pe cale sexuată, iar în altele o lungime a telomerelor chiar mai mare decât la animalele martor (ceea ce ar presupune o creştere a duratei lor de viaţă). Dacă luăm în consideraţie faptul că până la vârsta organismului ce urmează a fi clonat se produc inevitabil în celulele lui somatice o serie de erori şi tulburări genetice, observaţiile din urmă par surprinzătoare. Ne aflăm încă în faza de pionierat a experienţelor de clonare somatică, aşa încât sunt de aşteptat noi contribuţii şi probabil multe corective la ceea ce ştim în prezent.

Sunt de asemenea discuţii serioase privitoare la riscurile la care se expun clonele în condiţiile privării lor de una din trăsăturile esenţiale ale materiei vii – diversitatea genetică. Sexulitatea a fost una din achiziţiile majore ale organismelor vii pe parcursul evoluţiei, chiar dacă presupune un consum uriaş de materie şi energie pentru producerea elementelor

Scanned with OKEN Scanner

sexuale şi pentru întâlnirea lor, deoarece asigură pe de o parte sănătatea genelor, iar pe de altă parte procură o imensă variabilitate genetică organismelor sexuate. Importanţa procesului este demonstrată de faptul că şi unele procariote recurg la forme primitive de sexualitate, tocmai datorită avantajelor conferite de aceasta. Este cert faptul că uniformitatea genetică a animalelor domestice clonate le face mai vulnerabile în faţa unor factori de mediu nefavorabili (a agenţilor patogeni în special) decât rudele lor reproduse sexuat din gospodăriile oamenilor sau din complexele zootehnice şi mult mai sensibile decât cele sălbatice. O epidemie de grup apărută într-o populaţie de clone animale va decima întreaga populaţie, deoarece toţi indivizii din populaţie vor avea o rezistenţă asemănătoare la agentul patogen respectiv. Unii specialişti consideră însă că această problemă nu este una reală. Oricum prin selecţia îndelungată a plantelor de cultură şi animalelor domestice după criterii folositoare omului s-a ajuns la sărăcirea lor genetică, la o îngustare tot mai accentuată a diversităţii genetice a acestora, fapt ce a impus eforturi tot mai mari pentru protecţia lor. Se apreciază că există posibilităţi de contracarare a riscului menţionat prin promovarea în fermele individuale şi de producţie a mai multor familii de clone de elită şi realizarea de încrucişări între aceste clone. Reproducerea sexuată nu va fi deci exclusă, ci va fi folosită concomitent cu clonarea somatică. Cu siguranţă omul va găsi soluţii să iasă din acest eventual impas, totul e ca procesul de clonare să fie tot mai sigur, mai eficient şi clonele să se obţină la un preţ scăzut.

S-a constatat că animalele clonate pot da naştere la urmaşi prin reproducere sexuată şi că deci sunt fertile. Există de asemenea posibilitatea obţinerii de clone din clone la animale, se pare însă că eficienţa clonării în acest caz scade cu fiecare generaţie de clonare, că deci nu se poate reclona la infinit, dar nu se ştie şi de ce, (DONNARS et al., 2005).

4.3.4. Unele aplicaţii ale clonării somatice

Clonarea a stârnit un ecou puternic în opinia publică, dar şi vii dispute inclusiv în lumea ştiinţifică. Presa a pus mai mult accent pe riscurile clonării somatice şi s-a aplecat mai puţin asupra binefacerilor ei. Avantajele clonării nu sunt însă deloc de neglijat. Se vor putea obţine populaţii mai omogene de animale (vaci, oi, capre etc) de înaltă

Scanned with OKEN Scanner

performanţă, care au acelaşi ritm de creştere şi dezvoltare, au cerinţe identice faţă de condiţiile de întreţinere, au productivitate şi însuşiri de producţie asemănătoare, furnizează produse de aceeaşi calitate etc. S-ar putea accelera totodată ciclurile de selecţie ale unor animale (POSTEL-VINAY şi MILLET, 1997).

Clonarea animalelor devine promiţătoare şi sub aspectul producerii unor proteine de interes medical. Ea va permite multiplicarea unor animale transgenice care produc în laptele lor astfel de proteine. Cel mai adesea animalele transgenice se obţin prin inserţia genei străine, care determină o astfel de proteină, în ovul imediat după fecundare. Această tehnică necesită perfecţionări, deoarece inserţia transgenei este încă aleatorie, numărul de embrioni microinjectaţi care acceptă noile "instrucţiuni genetice" fiind redus. Clonarea însăşi vine în sprijinul acestei operaţii, în sensul că pot fi selectate celulele transgenice (care au gena integrată adecvat în genom) care, vor fi apoi cultivate şi folosite ca donatoare de nuclei în acţiunea de clonare şi producere de embrioni transgenici. În acest fel toate animalele clonate vor fi cu siguranţă purtătoare ale transgenei. La acelaşi Institut Roslin din Scoţia s-a obţinut în 1997 prima oaie transgenică (*Polly*), care producea în laptele ei factorul sanguin IX (pentru tratarea unei forme de hemofilie). In SUA s-a obţinut un grup de capre transgenice care produc în lapte antitrombina III (un anticoagulant), iar alt grup prezintă în lapte un anticorp monoclonal anticancer. Se preconizează clonarea unor animale transgenice care să acumuleze în laptele lor *alfa-1-antitripsina* (proteină candidat în tratarea mucoviscidozei) etc.

Prin folosirea clonării somatice se vor obţine în număr mai mare, într-un timp mai scurt şi cu cheltuieli mai mici şoarecii *"knockout"* (şoareci care au suspendată manifestarea unei gene), organisme extrem de utile în laboaratoarele de genetică la identificarea funcţiilor unor gene necunoscute. Vor putea fi de asemenea clonate animalele de experienţă din laboratoarele de profil, clone care având genomuri identice răspunde identic la un anumit agent, astfel încât va fi necesar un număr mult mai mic de animale test pentru obţinerea unor informaţii certe (se exclude variabilitatea individuală a animalelor obişnuite). Se pun mari speranţe şi în contribuţiile clonării la dezvoltarea operaţiilor de *xenotransplantare* (transplantarea de ţesuturi şi organe de la unele mamifere la om). Porcul pare a fi candidatul cel mai probabil pentru astfel de operaţiuni, atunci

Scanned with OKEN Scanner

când nu sunt disponibile pentru transplantare organe şi ţesuturi umane adecvate. Numai că în acest caz se pune şi mai acut problema compatibilităţii. S-au imaginat deja unele strategii care ar putea rezolva situaţia. Una dintre ele ar consta în inactivarea la porc a genei pentru enzima *alfa-galactoziltransferază* (porci knockout pentru această genă), care declanşează răspunsul imun la om. Vor putea fi probabil suspendate din funcţie şi alte gene ale complexului major de histocompatibilitate al porcului pentru a suprima reacţia de respingere a grefelor la om. Se preconizează ca pentru studiul unor boli genetice umane să fie folosite ca modele experimentale unele animale knockout (şoareci, oi) pentru a se urmări atât evoluţia bolii, cât şi eficienţa anumitor scheme de tratament. Un astfel de model pare să-l constituie oile pentru studiul *mucoviscidozei* (fibrozei chistice) la om. Se speră că aceste modele animale vor servi şi la elucidarea unor boli specifice acestora (cum ar fi encefalopatiile spongiforme, de exemplu). Clonarea somatică ar putea aduce contribuţii şi în domeniul terapiei cancerului, în sensul că ar putea fi înlocuită chimioterapia şi radioterapia citotoxică cu terapia citodiferenţierii, cu transformarea celulelor canceroase în celule normale. Acest lucru va fi posibil dacă se va demonstra că prin transplantarea nucleului unei celule canceroase într-o ovocită enucleată se poate induce diferenţierea normală a produsului obţinut, (CÎRLAN, 2001).

Clonarea somatică va contribui şi la înţelegerea unor fenomene de ordin teoretic din domeniul geneticii. Se ştie bunăoară că unul din cei doi cromosomi X la femele se inactivează întâmplător (indiferent de proveniența lui) în stadiul de blastocist, pentru echlibrarea dozei genelor X-linkate la cele două sexe. Deocamdată nu se ştie cum se reactivează cromosomul X inactiv în nucleul unei clone somatice femele, dacă ulterior inactivarea unuia din cei doi cromosomi X are loc întâmplător şi se produce în toate celulele somatice sau nu, precum şi consecinţele situaţiei în care ambii cromosomi X rămân activi. O altă problemă interesantă este cea a relaţiei dintre clonarea somatică şi *imprimarea genomică*. S-a demonstrat că exprimarea unei gene depinde şi de proveniența ei (de la mamă sau de la tată), că deci cromosomii setului matern şi a celui patern poartă o amprentă proprie căpătată în procesul de gametogeneză, care-i face uşor de recunoscut în celulele somatice. Deşi se transmite mendelian, un locus imprimat se va exprima funcţie de originea parentală. Genele imprimate (în număr de peste 40 la şoarece şi

Scanned with OKEN Scanner

om) intervin în procesul de dezvoltare a organismului (în creşterea şi dezvoltarea placentei, sacului vitelin, a foetusului, în inactivarea cromosomului X etc). E posibil ca în clonarea somatică să se producă erori ale imprimării genelor sau modificări ale acestor gene etc, care ar putea antrena o serie de tulburări în exprimarea lor şi implicit ale procesului de dezvoltare. Se consideră, de exemplu că sindromul produşilor voluminoşi (frecvent în clonarea somatică), sau unele anomalii de dezvoltare observate la mieii şi viţeii obţinuţi prin clonare somatică s-ar datora tocmai modificării amprentei (imprimării) genomice.

Clonarea ar putea deveni un instrument eficient în salvarea unor specii de animale pe cale de dispariţie şi, paradoxal, chiar pentru păstrarea diversităţii genetice. În acest sens, băncile de gene vor asigura conservarea (în azot lichid) de celule somatice de la femele de elită, material seminal de la masculi performanţi, embrioni clonaţi, care ar putea fi utilizate atunci când se constată sărăcirea genetică în cadrul unor grupe de animale domestice.

În ultimul timp se vorbeşte tot mai mult despre clonarea terapeutică, adică de obţinerea de *celule suşă embrionare* (CSE), care se speră să poată fi folosite în terapeutică. Şi în acest caz este vorba de obţinerea unui embrion, numai că acesta este cultivat *in vitro* până la stadiul de blastocist (până la vârsta de 7 zile, cu alte cuvinte), moment în care dacă el nu este transferat într-un uter îşi încetează dezvoltarea. Obiectivul clonării terapeutice este deci de a obţine embrioni în stadiul de blastocist de la care să se preleve celule din *butonul embrionar*, (CSE). Se pare că în februarie 2004 o echipă de cercetători coreeni au realizat prima dată o linie de celule suşă embrionare umane de la un embrion obţinut prin clonare (folosind 242 ovocite provenite de la 16 donatoare), (DONNARS et al., 2005). CSE sunt *pluripotente* şi deci teoretic pot fi capabile să diferenţieze în oricare tip de celulă, astfel încât ar putea fi folosite în tratarea unor boli ce presupune deficienţa unui tip celular dat. De ce embrioni clonaţi şi nu embrioni supranumerari? Embrionii clonaţi pleacă de la celulele pacientului ce urmează a fi tratat, astfel încât se obţin CSE compatibile cu pacientul şi se evită tratamentul imunosupresor. Este clar că tratamentul poate fi aplicat numai în cazul cînd nu este vorba de o boală genetică, pentru că altfel lucrurile se complică, fiind necesară mai întâi terapia genică a bolii şi apoi folosirea

Scanned with OKEN Scanner

celulelor respective. Întrucât distanța dintre speranțe și realizări în acest domeniu este enormă, se pare că în prezent se poate vorbi mai degrabă de *clonare științifică* și nu *terapeutică*, cum arăta DONNARS et al. (2005), liniile CSE provenite de la embrionii clonați servind mai mult la studiul mecanismului bolilor decît la tratarea bolnavilor.

4.3.5. Implicații bioetice ale clonării somatice

Ca orice achiziție nouă a cunoașterii umane și clonarea somatică a stârnit, așa cum am mai arătat, dispute vii, proteste și chiar interdicția de a fi practicată într-un anume scop. Este firesc am spune ca opinia publică să rămână vigilentă față de orice cucerire care s-ar putea întoarce ca un bumerang împotriva ei mai devreme sau mai târziu. A fost cazul multor descoperiri științifice umane, (între ultimele figurând practicarea tehnologiei ADN-recombinant și a transgenezei la organismele vii). Cel mai relevant exemplu poate îl reprezintă descoperirea radiațiilor și a radioactivității naturale și artificiale, care pe lângă numeroasele binefaceri aduse omenirii, incumbă câteva pericole potențiale majore ca: proliferarea armelor atomice, contaminarea radioactivă a mediului și de aici creșterea incidenței unor boli genetice și a cancerului etc. Poate omul să renunțe la folosirea acestui agent fizic? Evident că nu, pentru că are implicații în cele mai diverse sfere ale activității umane (GHIORGHIȚĂ și CORNEANU, 2002). Tot așa se va întâmpla și cu clonarea, în măsura în care ea va fi demitizată și omenirea va conștientiza mai bine nu numai riscurile, ci și avantajele practicării ei. Succesul Dolly a făcut ca în aprilie 1997, în cadrul unei Conferințe Internaționale ce a avut loc la Oviedo (în Spania) să se semneze (de către 21 de state) Convenția Europeană privitoare la drepturile omului și cercetările medicale, în care se stabilesc o serie de principii ca: interdicția de a interveni asupra genomului uman în scopul schimbării caracterelor ereditare, a clonării umane, a implantării de blastocişti umani în uterul altor specii, a fuziunii gameților de om cu gameții altor specii, a producerii de embrioni umani pentru cercetare, a utilizării organelor și țesuturilor umane pentru profit, a discriminărilor de ordin genetic, dreptul omului de a accepta sau nu o anumită intervenție asupra sa în scop medical etc.

Cea mai mare îngrijorare o reprezintă clonarea umană. Este cert în momentul de față că o astfel de operație este tehnic posibilă și la om. Manipulările impuse de realizarea unei clone somatice la om pot antrena

Scanned with OKEN Scanner

riscuri importante de sănătate, care nu pot fi acceptate. După cum am dedus din cele prezentate anterior mai sunt încă multe de pus la punct pentru succesul garantat al unei operații de clonare la animale, cu atât mai mult la om. Evident că într-o zi toate aceste riscuri vor putea fi evitate. Se va accepta atunci clonarea reproductivă la om?! Probabil că nu, pentru că e împotriva firii, e împotriva cursului firesc al vieții, dar este foarte posibil ca ea să fie practicată clandestin. Deja s-au pus la cale scenarii şi s-au găsit circumstanțe de acceptare a ei pentru situații de genul: pentru a ajuta cuplurile vârstnice şi infertile de a avea copii, pentru clonarea unui copil bolnav incurabil de rinichi care nu poate decât astfel obține un rinichi pentru transplant, pentru satisfacerea dorinței de a avea copii în cuplurile de lesbiene, pentru clonarea unui celibatar convins care-şi doreşte descendenți, pentru clonarea unui copil condamnat dispariției în cazul unor cupluri care nu mai pot procrea din diverse motive etc. Clonarea asigură într-un anume fel *nemurirea* şi de aceea tentația va fi foarte mare pentru unii semeni de-ai noştri care-şi doresc acest lucru şi au şi resurse materiale în acest scop. Se aduce ca argument pentru acceptarea ei însăşi existența fenomenului natural, a gemenilor monozigoți. Desigur că problema clonării este foarte "caldă" şi controversată în rândul opiniei publice pentru a fi acceptată, aşa încât este dificil de prevăzut viitorul ei. Dacă ne gândim că nu cu foarte mulți ani în urmă au stârnit dispute şi problema transplanturilor de organe la om, a fecundării *in vitro* la om, tehnici care acum se practică pe scară largă, este posibil ca şi clonarea la om să fie reglementată, acceptată şi practicată în anumite condiții.

5. BIOTEHNOLOGII UTILIZATE ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

Sectorul alimentar a fost cel în care, încă din antichitate, omul a utilizat empiric unele biotehnologii pentru obținerea unor produse de fermentație cum ar fi: berea, vinul, oțetul, pâinea, unele brânzeturi, murăturile etc. Descoperirea microorganismelor a condus la dezvoltarea unei industrii de profil, fundamentată ştiințific, pentru obținerea unor produse alimentare de fermentație. În cele ce urmează vom prezenta câteva dintre biotehnologiile utilizate în industria alimentară, fără a intra

Scanned with OKEN Scanner

în detalii, întrucât acestea au devenit clasice şi fac obiectul unor discipline de sine-stătătoare care se predau în facultăţile de profil.

5.1. Biotehnologii pentru prepararea de produse din lapte

Laptele este un produs complex, specific femelelor de mamifere şi obţinut în cantităţi industriale prin creşterea vacilor, bivolităelor în special, dar şi a oilor, caprelor etc. Compoziţia chimică a laptelui diferă funcţie de specie, rasă, calitatea hranei administrate animalului etc. Laptele de vacă are în componenţa lui: glucide solubile (cca 4-6%) reprezentate mai ales prin lactoză, galactoză, galactoză şi acid sialic; grăsimi (cca 2,5-4,5%) aflate sub formă de micropicături globulare; substanţe cu azot (cca 2,5-4%) constituite din cazeină, proteine solubile (lactoalbumine, lactoglobuline, imunoglobuline, serumalbumine) şi azot neproteic (uree, acid uric, etc.), săruri minerale (cca 0,7 – 1%) în stare solubilă; vitamine şi enzime în cantităţi foarte mici (fig. 5.1). Micelele de cazeină au diametrul de 150-160 nm şi sunt formate din submicele legate prin fosfat de calciu. Caseina se află în lapte sub forma unor particule sferice constituite din patru fracţiuni, notate cu α, β, ℘ şi K, cea mai reprezentativă fiind fracţia α (45-55% din total), apoi β (25-37%) şi K (8-15%).

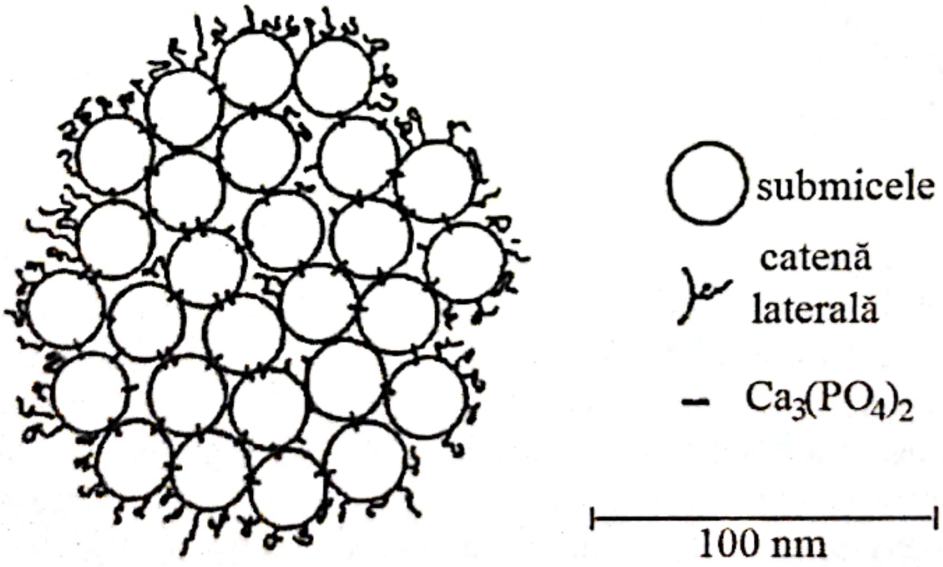


Fig. 5.1. Structura micelelor de cazeină, (după MILICĂ, 1999)

Stabilitatea micelelor este asigurată de fracţiunea K, (MILICĂ, 1999). Coagularea laptelui este posibilă datorită cazeinei, care este o fosfo-

Scanned with OKEN Scanner

proteidă organo-minerală, aflată în lapte sub formă de micele, (datorită fosfatului de calciu coloidal). În prezența acidului lactic, acesta trece din stare coloidală în stare solubilă, se leagă cu caseina prin legături fosforilate şi la pH de 4,6 (punctul izoelectric) caseina precipită. Precipitarea caseinei are loc şi prin încălzire, când sub acțiunea unor proteaze (la pH = 5-6) se transformă în *paracaseină*.

Produsele din lapte au la bază fermentația de către bacteriile lactice a glucidelor din acesta, reprezentate prin lactoză, galactoză, glucoză. Sub acțiunea β-galactozidazei are loc hidroliza lactozei cu formarea de galactoză şi glucoză, care determină îndulcirea laptelui, producând şi riscul de cristalizare. β-galactozidaza este o enzimă care acționează la pH slab acid, prezentă la unele drojdii ca: *Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces fragilis, Candida pseudo-tropicalis* şi bacterii, ca: *Lactobacillus bulgaricus, Escherichia coli, Bacillus stearothermophillus*.

Fermentația lactozei din lapte poate fi de mai multe tipuri, funcție de microorganismele şi enzimele lor specifice care o metabolizează: lactică, butirică, acetono-butirică, propionică. Fermentația poate fi realizată de: bacterii *homofermentative* (specii din genurile *Streptococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Bacillus, Phycomyces,* etc), care acționează la pH acid şi care duc la formarea a peste 90% acid lactic (ca produs final), cantități mici de glicerol, iar la pH bazic determină sinteza de acid acetic, formic, etanol, (fig. 5.2); sau de microorganisme *heterofermentative*, cum ar fi bacteriile de genul *Leuconostoc* (*L. brevis, L. buchnerii*) şi mucegaiurile din genul *Rhizopus* (*R. oryzae*). Produşii finali în cazul fermentației heterolactice sunt: acidul lactic, etanolul, acidul acetic, dioxidul de carbon, (fig. 5.3).

Fermentația butirică este realizată de specii din genurile *Clostridium, Neisseria, Butyribacterium, Zymosarcina*, care utilizează acidul lactic ca sursă de energie, cu formarea de acid butiric, acid acetic, dioxid de carbon şi hidrogen. Unele specii de *Clostridium* pot degrada mai departe acidul butiric la alcool butilic.

Fermentația propionică este realizată de bacterii (strict sau facultativ anaerobe) din genurile *Propionibacterium, Corynebacterium, Clostridium, Neisseria, Veillonela* care degradează lactoza, glucoza, acizii şi alcoolii la acid propionic. În prezența unor vitamine, bacteriile propionice pot produce (la intervenția peptidazelor), aminoacizi esențiali.

Scanned with OKEN Scanner

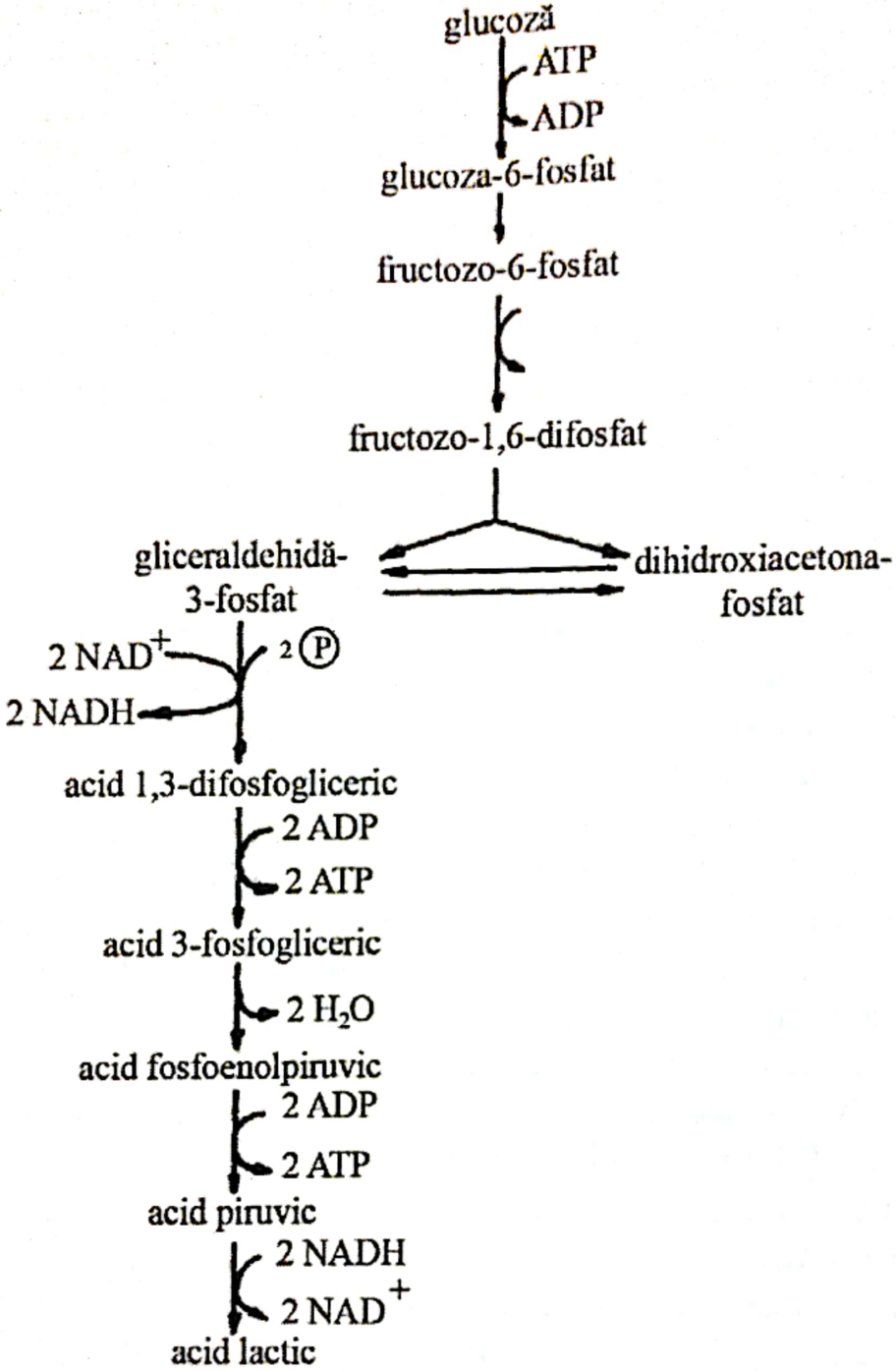


Fig. 5.2. Reacţiile fermentaţiei homolactice, (după MILICĂ, 1999)

În laptele crud se găsesc atât bacterii utile (cum sunt cele lactice şi propionice), cât şi unele nedorite (cum sunt cele butirice, acetice, de putrefacţie). Laptele crud înglobează şi unii inhibitori naturali ai fermentaţiei lactice (cum ar fi *lactenina*), iar unele bacterii lactice au capacitatea de a produce antibiotice, antiseptice etc, care pot provoca perturbări ale fermentaţiei lactice.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

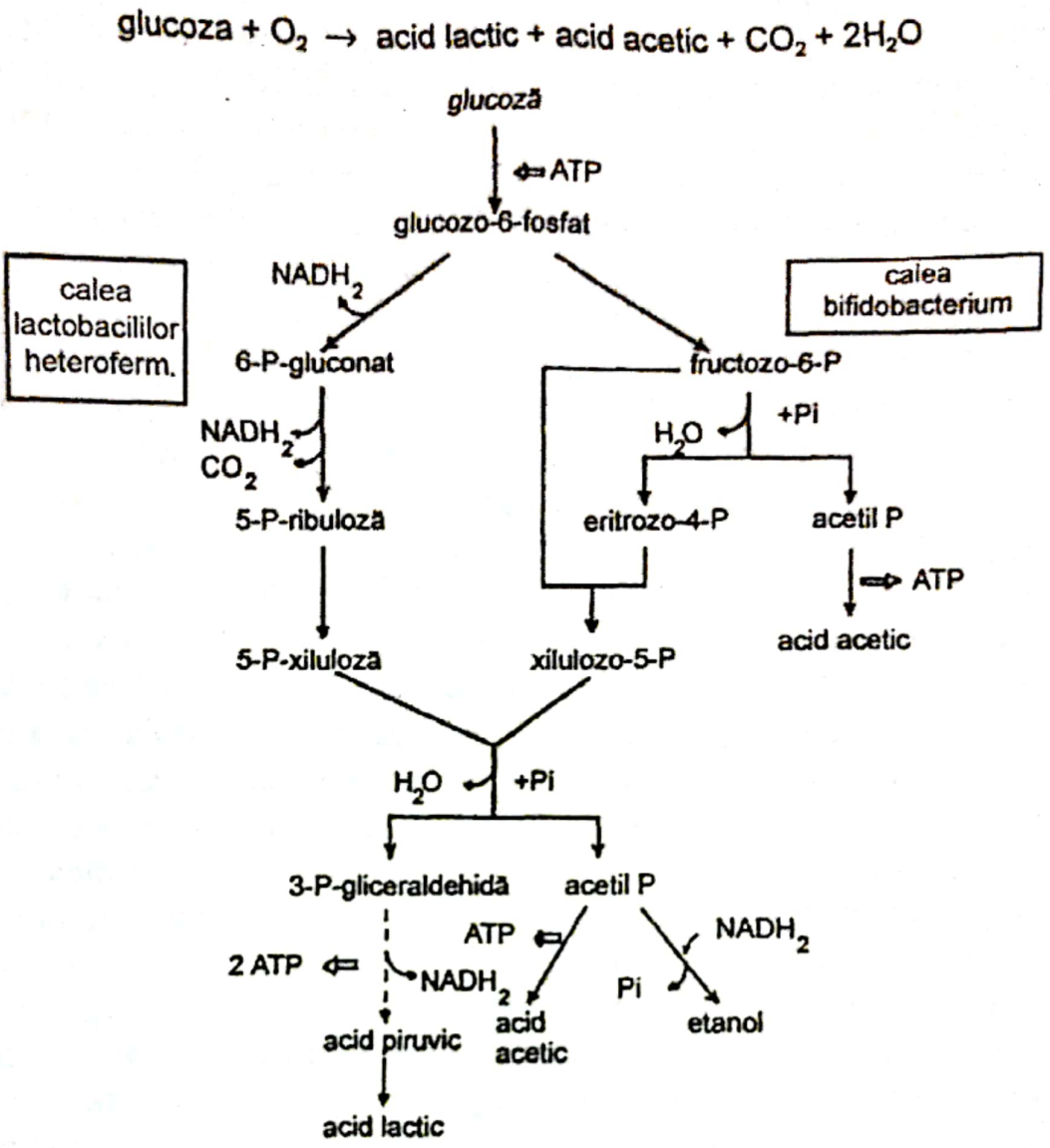


Fig. 5.3. Reacțiile fermentației heterolactice, (după MILICĂ, 1999)

De asemenea, prezența penicilinei poate influența negativ fabricarea brânzeturilor cu pastă tare, deoarece inhibă activitatea streptococilor (situații în care în lapte se adaugă penicilinaze).

Se consideră că pentru fabricarea brânzeturilor, laptele trebuie să conțină minim 50% bacterii lactice (genurile *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus*) din microflora totală. Contaminarea laptelui cu bacterii din genul *Listeria* este foarte păgubitoare, mai ales pentru prepararea brânzeturilor cu pastă moale, (MILICĂ, 1999).

Cele mai folosite bacterii în industria laptelui sunt *Lactobacillus lactis* și *Lactobacillus bulgaricus*, care asigură prepararea laptelui acru, a chefirului, iaurtului, cumâsului, brânzeturilor italiene, brânzei

Ementhal. Alte bacterii lactice utile din acest gen sunt *Lactobacillus casei, L. jogurtii, L. acidophillus, L. helveticus, L. keferi, L. plantarum,* etc. Unele din aceste specii acţionează la temperaturi optime mai ridicate (37-45^{0}C), altele la temperaturi optime mai scăzute (28-30^{0}C).

Între bacteriile lactice utile intră şi specii de *Streptococcus* (*S. lactis, S. thermophillus, S. pyogenes, S. liquefaciens,* etc.) şi de *Leuconostoc* (*L. citrovorus, L. mezenteroides, L. diacetilactis*).

5.1.1. Producerea iaurtului

Iaurtul este un preparat tradiţional provenit din Asia Centrală, de unde s-a răspândit în toată lumea. Se prepară din lapte de oaie, vacă sau bivoliţă, care se încălzeşte la 85^0 timp de 30 de minute (sau la 90 – 95^0 C timp de 5 – 10 minute), apoi se răceşte la 40-45^{0}C, după care se inoculează cu cultură de *Lactobacillus bulgaricus* (cca 1% din masa laptelui). La intervenţia β-galactozidazei, cca 20-30% din lactoză se transformă în galactoză şi glucoză, iar glucoza urmează calea glicolitică şi se transformă în acid piruvic şi apoi în acid lactic. Concomitent intervine şi specia *Streptococcus thermophillus* care metabolizează lactoza la acid lactic. Proteazele unor specii de *Lactobacillus* transformă proteinele din lapte în peptide şi aminoacizi. În urma proceselor fermentative se produc şi alţi compuşi organici (acetaldehidă, acetonă, etanol, etc) care contribuie la stabilirea însuşirilor organoleptice ale iaurtului. Prin fermentaţie are loc mai întâi coagularea laptelui sub formă de micelii şi apoi dezagregarea acestora prin eliberarea sărurilor de calciu datorită acumulării de acid lactic. Stoparea procesului de fermentaţie se face prin răcire la 2 - 4^{0}C, după care iaurtul se conservă la temperaturi sub 8^{0}C până la desfacerea lui pe piaţă.

5.1.2. Prepararea brânzeturilor

Pentru prepararea brânzeturilor, laptele este supus unor operaţii succesive ca: filtrarea, omogenizarea, pesteurizarea şi concentrarea coagularea şi presarea coagulului pentru eliminarea zerului şi formarea pastei de brânză, fermentarea şi maturarea brânzeturilor, etc.

Prin omogenizare se realizează mecanic o fragmentare a grăsimilor, care asigură o creştere a vâscozităţii laptelui şi o uniformizare a cantităţii de grăsimi în masa acestuia. Pasteurizarea reprezintă un tratament termic al laptelui crud la temperaturi de peste 60^{0}C, care are ca

Scanned with OKEN Scanner

scop înlăturarea unor microorganisme dăunătoare aflate în lapte, cum ar fi bacteriile sporulate anaerobe din genul *Clostridium*, sau bacilul tuberculozei (*Mycobacterium tuberculosis*) etc. Pentru prepararea de brânzeturi proaspete, pasteurizarea este o operație obligatorie, pentru distrugerea unor bacterii patogene aflate în laptele crud. Pasteurizarea induce însă și o serie de modificări biochimice în lapte, cum ar fi: schimbarea conformației moleculare a fracțiilor de cazeină, stabilirea de legături disulfidice între β-lactoglobulină și caseina-K etc, fapt ce determină schimbarea capacității de coagulare a laptelui, (MILICĂ, 1999). Concentrarea laptelui se asigură prin diverse procedee care asigură creșterea dimensiunilor micelelor și particulelor de fosfocaseinat de calciu din lapte, fapt ce determină mărirea vitezei de coagulare și reducerea timpului de maturare. Pentru concentrare, laptele este suplimentat cu zahăr (12%) și este supus evaporării apei până la un volum de 1/2 - 1/3 din cel inițial, operație care asigură o concentrație de cca 60% lactoză, fapt ce inhibă dezvoltarea microorganismelor dăunătoare.

Coagularea laptelui se poate realiza prin acidifiere (scăderea pH-ului sub 4,6), prin folosirea unor enzime animale sau microbiene (obținute din culturi de *Mucor pusillus, M. miechei, Endothia parasitica*, etc) ori cel mai frecvent, prin utilizarea cheagului de miel, ied, vițel neînțărcați, și constă în transformarea caseinei în paracaseină insolubilă. Cheagul reprezintă un preparat enzimatic format din chimozină și pepsină obținut din stomacul glandular al mieilor, iezilor și vițeilor sacrificați în perioada de alăptare (hrăniți numai cu lapte). Chimozina este o protează activă în mediu acid și la temperaturi ce nu depășesc 50^0C. În cheag, chimozina se află sub formă inactivă (de prochimozină), iar prin acidifiere este activată. Ea determină coagularea laptelui. Pepsina este o peptidază care coagulează doar laptele cu pH ușor acid (sub 6,6). Cheagul se folosește la coagularea laptelui pentru obținerea brânzeturilor cu pastă tare și semitare, caseina din lapte (aflată sub formă de fosfo-caseinat de calciu) trecând în stare de gel precipitat. Prin presare și deshidratare, după 20-22 ore se obține pasta de brânză care se sărează (fie în stare uscată, fie prin saramurare), acțiune care determină continuarea procesului de eliminare a apei și insolubizarea caseinei (care favorizează apariția crustei).

Scanned with OKEN Scanner

După saramurarea şi uscarea brânzei are loc maturarea ei, operaţie în care cu ajutorul unor microorganisme specifice (aflate la suprafaţă sau în interiorul brânzei) se obţin diverse tipuri de brânzeturi, care diferă ca gust şi aromă, (MILICĂ, 1999). Maturarea este un rezultat al activităţii, enzimelor unor microorganisme. Într-o primă fază (maturarea primară) intervin enzimele proteolitice din bacteriile lactice şi pepsina din cheag, iar într-o fază ulterioară (maturarea secundară) are loc degradarea tot mai pronunţată a caseinei. În cursul acestui proces lactoza este degradată în acid lactic, propionic, acetic etc, caseina este transformată în albumoze, peptone, aminoacizi, grăsimile sunt degradate parţial – cu formarea de acizi graşi liberi, glicerol şi chiar cetone etc.

Procedeele moderne de maturare a brânzeturilor recurg la folosirea unor preparate enzimatice (extrase, de exemplu, din culturi de *Streptomyces* sp. sau *Aspergillus flavus*, etc) care asigură un control al proceselor de proteoliză şi lipoliză şi o scurtare a duratei maturării, în condiţiile păstrării calităţii produsului final.

În funcţie de microorganismele utilizate în procesul de preparare a brânzeturilor, acestea sunt de 4 tipuri: brânza albă, brânzeturile cu pastă moale, semitare şi tare.

Brânza albă, se obţine din brânza proaspătă care are o încărcătură microbiană foarte mare (3-5 miliarde/gram), dar care prin sărăturare se reduce treptat atingând după 6 luni cca 10 milioane/gram. Este un produs al activităţii unor microorganisme ca: *Streptococcus lactis, S. cremoris, S. diacetilactis, Leuconostoc citrovorum, L. dextranicum.*

Dintre brânzeturile cu pastă moale (care conţin cca 50-80% apă), una dintre cele mai cunoscute este brânza de *Camembert*, care foloseşte ca principal microorganism de fermentaţie specia *Penicillium camembertii.* Se obţine din lapte de vacă (crud sau pasteurizat), care se acidifiază la pH slab acid (pH=5,85-6,20) în bazine de 100 litri, la care se adaugă pentru coagulare culturi pure de bacterii lactice (*Streptococcus lactis, S. cremoris, S. diacetilactis* (15-20 ml / bazin) şi apoi spori din mucegaiurile *Penicillium camembertii, P. candidum*, care asigură aroma specifică. Datorită dezvoltării la suprafaţă a unor bacterii proteolitice care acţionează la pH-ul alcalin (*Staphylococcus xylosus, Brevibacterium linens, Arthrobacter globiformis)* brânza de Camembert prezintă o culoare gri-albicioasă sau roşiatică. Aroma şi culoarea depind de

Scanned with OKEN Scanner

condiţiile în care se produce maturarea ei şi de suşele microbiene folosite în acest scop.

Dintre brânzeturile cu pastă semitare (care au 40-45% apă), foarte cunoscută şi apreciată este brânza *Roquefort* obţinută din lapte de oi (rasa *Lacaune)*. Laptele şi coagulul se însămânţează cu spori ai mucegaiului *Penicillium roquefortii* care se dezvoltă în condiţii de pH acid (pH=4,8-6,0), la temperaturi sub 35^{0}C, oxigenare mai slabă şi care suportă concentraţii ridicate de sare (5,8%). Prin activitatea enzimatică a acestei specii se eliberează o serie de acizi graşi (caproic, caprilic, caprinic) şi unele metil-cetone care dau un gust picant şi o aromă specifică brânzei de *Roquefort*. Alte bacterii ca *Streptococcus lactis şi S. cremoris* dau acestei brânze gustul de caşcaval prin degradarea acidului lactic la acid propionic.

Dintre brânzeturile cu pastă tare (care au sub 40% apă) fac parte o serie de caşcavaluri ca : *Schweizer* (Elveţia), *Cheddar* (Anglia), *Colby* (SUA), *Edam* şi *Gouda* (Olanda) etc, care diferă în funcţie de procesul de fabricare şi microorganismele utilizate în acest proces. În cazul schweizerului cea de a doua încălzire a coagulului se realizează la o temperatură mai mare (51-58^{0}C), care împiedică dezvoltarea unor specii obişnuite de streptococi şi lactobacili (*Streptococcus lactis, Lactobacillus bulgaricus)*, dar permite supravieţuirea celor termofile (*Streptococcus thermophillus, Lactobacillus helveticus*), care determină o creştere a acidităţii (la pH=5,2). La producerea schweizerului, alături de microorganismele menţionate participă şi specii de *Propionibacterium (P. freundenreichii, P. shermanii)*. Prin acţiunea bacteriilor propionice se produc acizi organici (propionic, succinic, acetic, formic), ce conferă schweizerului gustul şi aroma specifice. Orificiile care apar în masa acestuia se datorează CO_2 degajat din fermentaţia propionică, a cărui presiune este mai mare decât vâscozitatea pastei. În cazul caşcavalului Cheddar, datorită unei temperaturi mai scăzute la a doua încălzire (40-45^{0}C) este favorizată dezvoltarea bacteriilor lactice, care determină acumularea de acid lactic şi acidifierea pastei, fapt ce nu permite proliferarea bacteriilor propionice. Gustul şi aroma specifice sunt date de o serie de aminoacizi liberi şi a *tiraminei* (amină aromată derivată din tirozină). La caşcavalurile olandeze, a doua încălzire a laptelui se face la o temperatură şi mai scăzută (40^{0}C), care permite nu numai supravieţuirea bacteriilor lactice, ci şi a celor peptonizante din cheag, iar

Scanned with OKEN Scanner

gustul lor dulce este asigurat de unii aminoacizi ca leucina, prolina şi acidul aspartic, (MILICĂ, 1999).

5.2. Obţinerea de produse de fermentaţie din soia

Încă din timpuri străvechi semințele de soia au stat la baza obținerii unor produse alimentare de fermentație mai ales în țările din Orientul Extrem. Semințele de soia sunt recunoscute şi larg folosite în industria alimentară datorită conținutului lor ridicat în proteine (cca 38%) şi lipide (18%), dar şi cantității de microelemente, vitaminelor din grupa B etc. Iată (după SASSON, 1993) câteva dintre produsele de fermentație obținute din soia.

Miso se obține în Japonia şi China prin hidratarea şi apoi fierberea sub presiune (timp de 30-40 minute) a semințelor de soia, iar pasta obținută se supune fermentației (la 27-35^{0}C) cu mucegaiurile *Aspergillus oryzae* sau *A. sojae*. Acest miso poate avea la bază şi semințe de orez. În acest caz, semințele de orez se hidratează şi fierb (cca 40 minute), pasta obținută fiind supusă fermentației cu *Aspergillus oryzae* (la 30^{0}C) într-un fermentator cu agitație continuă timp de 40-80 ore. Pentru a inhiba creşterea mucegaiului se adaugă sare. Peste pasta de orez se adaugă pastă din semințe de soia (după procedeul prezentat anterior), iar amestecul este supus unei noi fermentații (la 30^{0}C şi umiditate 60-70%) cu *Aspergillus oryzae* timp de 15 zile (miso dulce) sau 3-4 luni (miso sărat). Prin esterificarea acizilor graşi din compoziția pastei, miso capătă o aromă specifică. Produsul se foloseşte ca ingredient în prepararea supelor de legume sau în calitate de condiment în preparatele de peşte, carne etc.

Tempeh – este un produs alimentar obținut în Indonezia din semințe de soia fierte în apă timp de 90 minute, la care se adaugă arahide sau nuci de cocos, după care pasta se însămânțează cu spori de mucegaiuri din genul *Rhyzopus* (în special *R.. oligosporus,* dar şi *R. oryzae, R. stolonifer, R. arrhizus*). Fermentația se produce la temperatura de 31^{0}C timp de 36-38 ore. Trebuie evitată contaminarea pastei cu mucegaiul *Aspergillus flavus* care poate sintetiza unele toxine. Tempehul reprezintă un aliment ce conține o cantitate mare de proteine (50-55%), lipide (20-25%), acizi graşi liberi, vitamine din grupa B.

Natto – este un produs japonez obținut din semințe mici şi uniforme de soia, fierte în apă, pasta ce rezultă fiind însămânțată cu spori de *Bacillus natto*. Procesul de fermentație se realizează la temperatura de

Scanned with OKEN Scanner

40-42^{0}C şi umiditate de 80-90% timp de 18-20 ore, după care are loc maturarea produsului la temperaturi mai scăzute (1-5^{0}C la început şi 5-10^{0}C după 2 zile) timp de două săptămâni. Natto conţine cca 16% proteine, 10% lipide, 10% glucide, vitamine, iar aroma specifică este dată de peptidele şi aminoacizii rezultaţi din proteoliză. Se foloseşte ca aromatizant pentru carne fiartă, peşte şi legume.

Sufu - este un produs preparat în China din seminţe de soia în apă, apoi strivite şi fierte în apa respectivă până la obţinerea unei paste lăptoase, care se răceşte şi se strecoară. Laptele rezultat se coagulează cu sulfat de calciu sau magneziu (2-3%) apoi se inoculează cu unele specii de mucegaiuri ca: *Mucor hiemalis, M. silvaticus, Rhizopus chinensis, Actinomucor elegans.* Pe parcursul fermentaţiei are loc hidroliza proteinelor şi lipidelor din laptele de soia, iar din combinarea unor acizi graşi şi alcooli rezultaţi din fermentaţie se formează esteri, care conferă produsului un gust plăcut. Fermentaţia se realizează la temperatura de 12-20^{0}C timp de 7 zile, după care produsul se saramurează şi condimentează cu diferite esenţe.

Shoyu este un sos folosit drept condiment în Asia de Sud-Est, obţinut din soia sau amestec de soia cu cereale, care poartă diferite denumiri în funcţie de zona unde este produs, de consistenţa şi aroma lui. În Japonia se produc mai multe tipuri de sos de soia, în care intră în amestec soia şi grâul, dintre care mai răspândit este *Koikuchi* (amestec de 50% soia şi 50% grâu). Tehnologia de preparare a acestui sos presupune înmuierea seminţelor (sau făinii) de soia timp de 10-15 ore, fierberea acestora (sub presiune) timp de 1 oră, amestecul pastei obţinute cu seminţele de grâu prăjite şi măcinate grosier, inocularea cu culturi pure de *Aspergillus oryzae* sau *A. sojae* (1-2%), fermentarea amestecului obţinut timp de 2-3 zile la 25-30^{0}C, saramurarea lui (cu soluţie de 22-23% NaCl), inocularea cu culturi pure de *Pediococcus halophilus* (care produce acid lactic) şi *Saccharomyces rouxii* (care produce alcool etilic) timp de 8-12 luni (perioadă în care pH-ul scade la 4,9-4,7), presarea şi filtrarea produsului obţinut (pentru îndepărtarea reziduurilor) şi în sfârşit pasteurizarea lui la 70-80^{0}C. Produsul conţine proteine, aminoacizi, acizi organici, compuşi fenolici liberi etc.

Scanned with OKEN Scanner

5.3. Producerea de legume conservate prin fermentație lactică

Deşi conservarea legumelor prin fermentație lactică (pentru consumul uman pe toată perioada anului) este o metodă cunoscută şi folosită încă din antichitate, în toate țările dezvoltate ea este mai puțin utilizată în ultimele decenii, datorită extinderii metodelor de pasteurizare şi congelare. Chiar şi în aceste țări procedeul clasic este încă folosit pentru conservarea unor legume şi fructe, cum ar fi: varza, castraveții, tomatele verzi, țelina, ardeii iuți, măslinele, merele etc), datorită calităților organoleptice, aportului de vitamine şi săruri minerale, cheltuielilor energetice de producere mai mici, consumului lor mai cu seamă în sezonul nefavorabil (când lipsesc legumele şi fructele proaspete) etc.

Procesele fermentative se desfăşoară în funcție de specia conservată, de conținutul ei în zaharuri fermentescibile, de aciditatea mediului de conservare, de temperatură, aerare, expunere la soare etc. Prin conservarea legumelor şi fructelor în saramură sau oțet se realizează un mediu care permite dezvoltarea bacteriilor lactice Gram (+) şi inhibă dezvoltarea microbiotei Gram (-) şi a bacteriilor sporulate ce conțin enzime pectinolitice.

Bacteriile lactice sunt de două tipuri:

a) *homofermentative*, care produc prin fermentația substratului numai acid lactic;

b) *heterofermentative,* care în afară de acid lactic produc şi acid acetic, etanol, manitol, esteri etc, compuşi care conferă legumelor şi fructelor conservate arome.

Fermentația lactică a legumelor şi fructelor are loc în mai multe etape. Într-o primă fază (care la temperatura de 18-20^{0}C durează 2-5 zile) intervin bacteriile heterofermentative de tipul lui *Leuconostoc mesenteroides*, care prin metabolizarea zaharurilor solubile produc acid lactic, acid acetic, etanol, manitol, bioxid de carbon etc. S-a constatat că producerea de CO_2 este mai intensă dacă materialul biologic conservat este bogat în acizi organici şi aminoacizi. În această primă fază, pH-ul mediului de fermentație scade la cca 4,2 – fapt ce inhibă activitatea bacteriei *Leuconostoc mesenteroides*. În faza următoare care durează 21-30 zile, o serie de zaharuri nefermentate, inclusiv manitolul, se trasformă mai ales în acid lactic, dar şi în acid acetic, iar pH-ul mediului scade şi mai mult (4,1-3,8). În acestă etapă intervin în special bacteriile lactice

Scanned with OKEN Scanner

homofermentative ca: *Lactobacillus plantarum, Pediococcus pentosaccus* şi în mai mică măsură cele heterofermentative ca: *Lactobacillus brevis, Leuconostoc mesenteroides.* În cursul procesului de fermentaţie sunt eliberaţi compuşi volatili ca: aldehide, alcool izoamilic, hexanol, butirat de etil, etil-lactat, alil-izotiocianat etc, care conferă produselor conservate arome specifice. Pentru gust şi aromă se adaugă în vasele de fermentaţie şi alte produse vegetale ca: cimbru, mărar uscat, hrean, usturoi, lăstari de vişin şi stejar etc, ca şi conservanţi pentru împiedicarea dezvoltării drojdiilor şi mucegaiurilor la suprafaţa saramurii, (MILICĂ, 1999).

Scăderea pH-ului face ca resturile de glucide să fie fermentate de drojdii, bacterii acetice, butirice şi propionice, care determină o uşoară tulburare a saramurii. În sfârşit, când vasele în care se conservă legumele sunt deschise pentru consum, se produce contaminarea acestora cu levuri oxidative (*Candida, Debaryomyces, Pichia*), cu mucegaiuri şi bacterii aerobe, care realizează fermentaţii butirice, acetice etc, aciditatea scade, se formează acid butiric, se alterează gustul şi mirosul produselor conservate, consistenţa lor se reduce evident etc,

Produsele conservate sunt bogate în proteine, aminoacizi, acizi graşi, vitamine din grupa B etc. Legumele şi fructele murate au efecte antiseptice, mineralizante, laxative, colagoge, diuretice, stimulează funcţiile hepatice etc.

5.4. Producerea prin fermentaţie a acizilor organici

Unele microorganisme cultivate pe substraturi glucidice au capacitatea de a produce unii acizi organici care, în loc să alimenteze ciclul lui Krebs, se acumulează. În glicoliza anaerobă molecula de glucoză este transformată în două molecule de 3-fosfogliceraldehide, apoi în două molecule de acid piruvic. Acidul piruvic rezultat din degradarea glucozei sau a altor metaboliţi urmează în celulele vegetale, animale şi microbiene o serie de transformări succesive prin intervenţia unor enzime specifice în cadrul ciclului acizilor tricarboxilici (fig. 5.4), care au ca rezultat final producerea de CO_2, H_2O şi energie legată sub formă de ATP. Prin aceleaşi reacţii enzimatice, unele microorganisme transformă acidul piruvic în acid citric, în prezenţa acidului oxal-acetic.

Scanned with OKEN Scanner

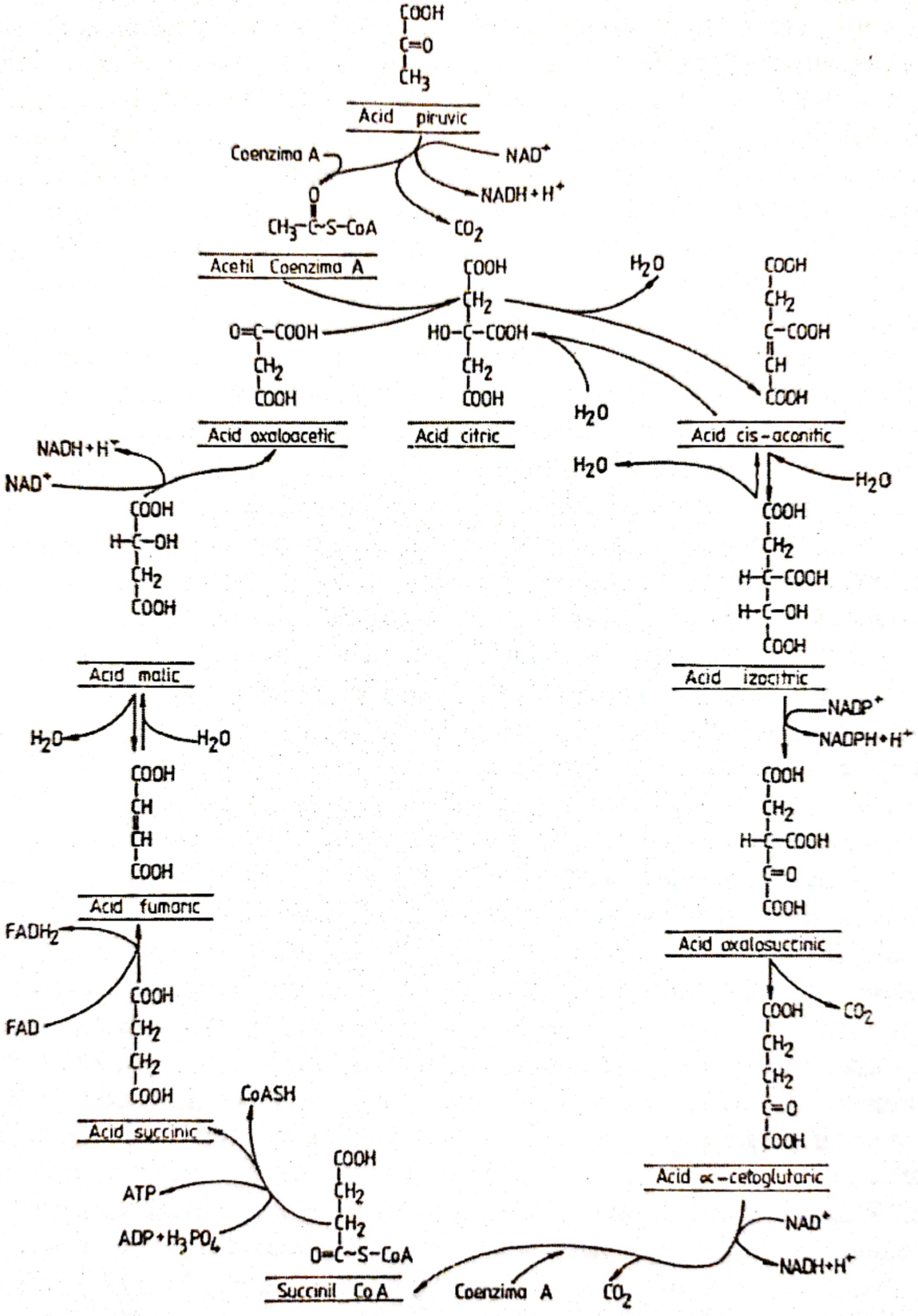
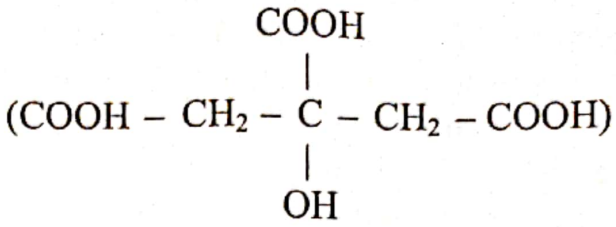


Fig. 5.4. Ciclul lui Krebs

Scanned with OKEN Scanner

Acidul citric



este produs în cantitate mare (sute de mii de tone anual) şi este utilizat în industria alimentară (la fabricarea unor produse de cofetărie, a băuturilor gazoase, a conservelor etc), în industria de pielărie etc. Pentru obţinerea industrială de acid citric se recurge la cultivarea speciei *Aspergillus niger,* deoarece prezintă un randament de producţie ridicat, manifestă constanţă genetică şi este mai uşor de cultivat. Capacitatea de a sintetiza acid citric aparţine însă şi altor specii ca: *Aspergillus clavatus, A. ventii, Penicillium citricum, P. luteum, Candida lipolytica, Mucor pyriformis etc.* La început, acidul citric a fost produs în culturi în suprafaţă, după metoda Currie, în care se foloseşte un mediu nutritiv ce conţine 12-15% zaharoză şi săruri minerale. Sărurile minerale au un rol decisiv în producerea acidului citric. Fermentaţia are loc în două faze: în prima se dezvoltă miceliul, iar în cea de a doua se acumulează acidul citric. În cea de a doua fază se intervine în mediu pentru blocarea activităţii *aconitazei* şi stoparea ciclului Krebs. Aconitaza are nevoie de ioni de fier (în calitate de cofactor) pentru a fi activă. Stoparea activităţii aconitazei se realizează prin intervenţia cu ioni de cupru (cuprul fiind antagonist al fierului), sau prin precipitarea fierului în mediul de cultură (cu ferocianură de potasiu, de exemplu).

S-au dezvoltat apoi metode de cultivare în profunzime a speciei *Aspergillus niger*, caz în care este necesar un control mai strict al condiţiilor de cultură: un inocul de bună calitate, un anumit conţinut în azot şi fosfor, ca şi al unor elemente minerale (fier, mangan, cupru, zinc), controlul temperaturii de fermentaţie specifice tulpinii utilizate, o aerare energică, folosirea antispumanţilor etc. În funcţie de aceste condiţii durata şi randamentul de producţie diferă destul de mult. După scurgerea perioadei de fermentaţie, se separă miceliul de lichidul de cultură, în care se adaugă carbonat de calciu pentru precipitarea acidului citric, cu formarea citratului de calciu. Precipitatul e tratat cu acid sulfuric şi se separă apoi precipitatul de sulfat de calciu format. În final are loc decolorarea cu cărbune activ, demineralizarea, concentrarea soluţiei de acid citric şi cristalizarea acestuia, (NIMIŢAN, 1992).

Scanned with OKEN Scanner

Acidul fumaric (COOH-CH=CH-COOH) este mult folosit în industria răşinilor şi sticlei sintetice, de aceea este produs în cantităţi foarte mari pe cale microbiologică. Capacitatea de biosinteză a acestui acid organic o au unele fungi din genurile *Mucor, Rhizopus, Circinella, Cuminghanella*. Se pare că acidul fumaric se acumulează la aceste specii datorită unei deficienţe a ciclului Krebs în *fumarază*. În practică acidul fumaric se obţine prin folosirea culturilor (în suprafaţă şi în profunzime) de *Rhizopus nigricans, R. oryzae, R. arrhizus,* pe medii ce conţin cantităţi determinate de glucoză, carbonat de calciu, fier, zinc.

Acidul gluconic (CH_2-CHOH-CHOH-CHOH-CHOH-COOH) poate fi produs prin fermentaţie fungică – realizată de specii din genurile *Aspergillus şi Penicillium* sau bacteriană – produsă de specii din genurile *Acetobacter (A. gluconicum, A. oxidans),* sau *Pseudomonas* (*P. fluorescens, P. ovalis*). În cazul fermentaţiei fungice, mediul de cultură conţine 35% glucoză, azot organic sub formă de uree sau extract de porumb, elemente minerale etc, în condiţii de pH=6,5 şi aerare bună, la o temperatură de fermentaţie de 34^0C. După ce concentraţia glucozei în mediu ajunge la 0,1% se separă biomasa de lichidul de fermentaţie, acesta se aduce la pH=7,5, şi apoi se elimină apa prin uscare. Dacă se folosesc bacteriile în procesul de fermentare, mediul de cultură va conţine 15% glucoză.

Acidul itaconic (CH_2=C-CH_2-COOH) este utilizat în industria de hîrtie
|
COOH
(în special pentru răşinile acrilice, care conţin 5% acid itaconic) şi de mase plastice (din care se fabrică unele fibre sintetice şi dinţii artificiali). Cel mai folosit microorganism în producerea acestui acid este *Aspergillus terreus*. Acidul itaconic provine din decarboxilarea acidului *cis-aconitic*. El poate fi obţinut şi prin sinteză chimică.

Cei mai folosiţi acizi organici sunt însă acizii lactic şi acetic, acizi care pot fi obţinuţi prin fermentaţie, dar şi prin sinteză chimică.

Acidul lactic (CH_3-CHOH-COOH) este produs de numeroase specii de bacterii, unele din ele acţionând atât în condiţii aerobe cât şi anaerobe. După produşii finali de fermentaţie rezultaţi, aceste bacterii au fost clasificate în:

a) *homofermentative* – care produc aproape numai acid lactic şi puţine gaze sau deloc

Scanned with OKEN Scanner

b) *heterofermentative* – care alături de acid lactic produc – acid acetic şi succinic, alcool, dioxid de carbon şi hidrogen.

Din prima categorie fac parte lactobacilii *(Lactobacillus lactis, L. delbruckii, L. acidophylus, L. caucasicus, L. bulgaricus, L. leichmanii)* şi streptococii lactici (*Streptoccoccus lactis*). Bacteriile heterofermentative au proprietatea de a metaboliza în special glucidele vegetale, deşi por fi întâlnite uneori şi în lapte şi produse lactate. Exemple din această categorie: *Lactobacillus bifidus, L. pasteurianum, L. dextranicum, L. citrovorum etc.*

[Bacteriile lactice sunt larg folosite în industria laptelui la prepararea iaurtului a unor băuturi din lapte (kefir, cumâs), la fermentarea smântânii pentru creşterea calităţii untului fabricat din aceasta la prepararea murăturilor, la însilozarea furajelor verzi şi borhotului de sfeclă pentru hrana taurinelor. Împreună cu alte bacterii participă la fabricarea şi maturarea brânzeturilor, sau în prepararea unor băuturi din cereale (bragă, cvas). Bacteriile lactice se folosesc şi la fabricarea drojdiei presate şi spirtului].

Pentru biosinteza acidului lactic este utilizată fermentaţia cu bacteria *Lactobacillus delbruckii,* atunci când substratul este constituit din amidon (din cereale, cartof), melasă, zaharoză, glucoză şi *Lactobacillus plantarum* când mediile de cultură au ca substrat zer şi leşii bisulfitice. Acidul lactic se foloseşte la acidifierea sucurilor şi esenţelor de fructe, siropurilor, produselor de cofetărie, la conservarea legumelor, cărnii, peştelui etc. Este de asemenea utilizat în industria farmaceutică şi de pielărie, la fabricarea maselor plastice etc, (NIMIŢAN, 1992)

Acidul acetic (CH_3-COOH) se obţine prin oxidarea alcoolului etilic de către bacterii din genul *Acetobacter* (*A. aceti, A. oxydans, A. suboxydans, A. pasteurianum etc*) care sunt obligat aerobe, dezvoltându-se la suprafaţa soluţiei alcoolice. Pentru fabricarea oţetului, cea mai bună materie primă o reprezintă vinurile (albe sau roşii) care au cca 8-9% etanol. Dacă vinul este mai slab, oţetul este de calitate inferioară şi greu de conservat. Oţetul poate fi obţinut şi din alcool, caz în care acesta se diluează la $10\text{-}12^0$ şi se adaugă unele substanţe nutritive. În zonele în care nu se poate cultiva viţa de vie, se folosesc la prepararea oţetului cerealele, malţul, berea, aceste oţeturi fiind însă mai slabe calitativ (lipsa aromei, gust neplăcut).

Scanned with OKEN Scanner

6. BIOTEHNOLOGII PENTRU PRODUCEREA DE ENERGIE

Criza mondială a petrolului din anii 1973-1974 a însemnat un serios semnal de alarmă în privința caracterului limitat al surselor de energie reprezentate de combustibilii fosili şi a necesității imperioase de identificare a unor surse alternative de energie. Dacă ne referim la producția mondială de energie electrică, se apreciază că cca 63% din aceasta provine din arderea combustibililor fosili, cca 20% din exploatarea potențialului hidroenergetic şi cca 17% din exploatarea energiei atomice. Ponderea unor surse alternative de energie, cum ar fi cea eoliană, solară şi din valorificarea biomasei, reprezintă doar cca 0,3% din producția mondială de energie electrică din lume.

Nivelul de dezvoltare economică şi de civilizație sunt strâns legate şi de producerea unor cantități tot mai mari de energie electrică. „Foamea" de energie este o componentă de bază a civilizației moderne. Se consideră că în 2025 populația globului va fi cu cca 60% mai mare, iar nevoile de energie vor creşte cu 50%. Cu siguranță în primele decenii ale acestui secol omenirea va apela tot la sursele convenționale de energie – ca surse de bază (în care va creşte probabil ponderea energiei obținute în centralele atomo-electrice), dar treptat vor fi puse în valoare, sau vor fi mai bine valorificate, energia solară, energia provenită din biomasă, cea obținută din arderea hidrogenului etc.

Fără îndoială că fotosinteza reprezintă pe Terra cel mai important proces biologic, care procură pe de o parte oxigenul necesar vieții imensei majorități a organismelor vii, dar şi sursa principală de hrană pentru numeroase organisme animale, inclusiv pentru om. Celula vegetală este capabilă ca prin intermediul pigmenților asimilatori să convertească energia luminoasă în energie chimică, prin transformarea unor substanțe simple şi sărace în energie - apa şi dioxidul de carbon - în hexoze, substanțe mult mai bogate în energie, procesul fiind însoțit şi de degajarea de oxigen molecular, potrivit reacției generale:

$$6\ CO_2 + 6\ H_2O + W\ \text{luminoasă} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

Deşi teoretic randamentul maxim de asimilare fotosintetică a carbonului poate atinge 33%, ținând cont de cantitatea de lumină primită şi de pierderile înregistrate prin respirație, randamentul real al fotosintezei se situează între 0,5 şi 3%, regnul vegetal utilizând doar

Scanned with OKEN Scanner

0,1% din energia luminoasă provenită de la soare. Cu toate acestea, fotosinteza este procesul care asigură întreținerea vieții pe Terra (L. ATANASIU, 1990).

În afara utilizării unor plante în alimentație, omul a folosit şi foloseşte o serie de plante pentru fabricarea textilelor, pentru construirea de adăposturi, pentru încălzire şi prepararea hranei etc. Chiar şi combustibilii fosili provin din transformarea biomasei în anumite condiții (de temperatură şi presiune) în perioade geologice trecute.

Specularea fenomenului de fotosinteză în producerea de energie se îndreaptă în două direcții:

- valorificarea fitomasei pentru producerea de substanțe cu proprietăți combustibile;
- reproducerea acestui fenomen în condiții industriale, prin realizarea de celule fotogalvanice (cu pigmenți asimilatori) şi producerea de hidrogen prin fotosinteză.

6.1. Biomasa ca sursă de energie

Potrivit informațiilor furnizate de SASSON (1988) biomasa vegetală uscată de pe Pământ este aproximată la peste 1800 miliarde de tone, din care cca 68% este reprezentată de păduri, 16% este furnizată de ecosistemele ierboase şi cca 8% de suprafețele cultivate. Anual se produc pe Terra prin fotosinteză cca 173 miliarde de tone substanță uscată (nu este foarte clar dacă aceste cifre iau în calcul şi biomasa vegetală furnizată de mări şi oceane). Oricum, cifrele avansate sunt impresionate şi subliniază odată în plus importanța covârşitoare a fotosintezei în aportul de biomasă pe planeta noastră.

Dacă în urmă cu mai bine de două secole necesarul de energie pe Pământ (aproape exclusiv termică) era asigurat prin utilizarea masei lemnoase a plantelor şi parțial a cărbunilor fosili, în prezent ea reprezintă numai cca 10% din consum, restul fiind acoperit de combustibili fosili (cărbune, petrol, gaze naturale). În zonele rurale însă, producerea de căldură din biomasă (lemn, cărbune din lemn, gunoi de grajd uscat etc) reprezintă încă 85% din nevoile energetice. Cel mai frecvent, energia încorporată sub formă chimică în biomasă este eliberată prin arderea acesteia. Un randament energetic superior se obține din transformarea biomasei (prin procese de fermentație specifice) în biogaz (în special metan) sau în alcool, (SASSON, 1988).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru producerea de energie din biomasă, specialiştii şi-au îndreptat atenţia către 3 categorii de plante:

- plante lemnoase cu creştere rapidă, care au conţinut înalt de substanţe celulozo-ligninice;
- plante aşa-zis alcooligene, care au un conţinut ridicat în glucide ce pot fi transformate în etanol;
- plante acvatice care au un ritm înalt de creştere şi care într-un timp scurt realizează o biomasă ridicată.

În prima categorie de plante sunt incluse unele specii forestiere cum ar fi eucaliptul, plopul, paltinul de munte, pinul etc, caracterizate prin creştere rapidă, specii care într-un interval de 5 -20 de ani ating producţii anuale de 8-20 tone de substanţă uscată la hectar. S-au izolat hibrizi şi forme ale speciilor menţionate capabile să valorifice terenuri improprii altor culturi, sărace în nutrienţi. Într-o serie de ţări ca Suedia, Canada, Brazilia, SUA, Australia etc, imediat după criza petrolului din 1974 s-au intensificat preocupările pentru realizarea de plantaţii cu unele din speciile amintite, plantaţii destinate obţinerii de biomasă pentru scopuri energetice. S-a pus de asemenea problema utilizării în această direcţie şi a deşeurilor rezultate din exploatarea pădurilor, care în unele ţări ating cantităţi foarte mari (în SUA, de exemplu, sunt apreciate la peste 100 milioane de tone anual). Biomasa obţinută din lemn şi deşeuri din lemn este transformată apoi (prin tehnologii adecvate) în metanol, cu un randament de cca 70%, (ATANASIU, 1990).

O atenţie specială în identificarea de soluţii energetice alternative s-a acordat în Brazilia, ţară în care s-a instituit acum mai bine de două decenii un program de reîmpădurire cu eucalipt pe o suprafaţă de 400.000 ha, masa lemnoasă urmând a fi folosită la producerea de cărbune din lemn şi metanol. Această specie prezintă o creştere rapidă, care poate asigura o biomasă anuală de cca 20 de tone/ha. Programe asemănătoare au fost lansate şi în Australia, Gabon etc. În alte ţări, inclusiv în România, s-a pus accentul pe realizarea de plantaţii cu hibrizi şi clone rapid crescătoare de plop, care pot valorifica terenuri cu troficitate scăzută sau cu exces de umiditate.

În categoria plantelor ierboase alcooligene intră o serie de specii bogate în amidon (maniocul, cartoful, porumbul), în zaharoză (trestia de zahăr, sfecla de zahăr, sorgul zaharat), în inulină (napul), în glucide hidrolizabile, care prin fermentaţie alcoolică pot fi transformate în etanol.

Scanned with OKEN Scanner

Acest alcool are întrebuinţări multiple: solvent, agent de extracţie, antigel, este utilizat la prepararea tincturilor, lubrifianţilor, adezivilor, detergenţilor, pesticidelor, la fabricarea fibrelor sintetice, la sinteza unor solvenţi etc. Etanolul poate fi folosit şi în calitate de carburant pentru motoarele cu combustie internă, fie ca atare – sub formă hidratată (94%), fie în amestec cu benzina într-o proporţie de 15-20% (*gusoohol*) când se află sub formă anhidră, (SASSON, 1988). Cel mai ambiţios program de utilizare drept combustibil a etanolului, „Pro-Alcool" a fost lansat în Brazilia în 1975, sursa de glucide pentru obţinerea etanolului fiind trestia de zahăr şi maniocul. Cinci ani mai târziu, se producea o cantitate de 37 milioane hectolitri etanol. Randamentul de producţie era de 80 litri etanol la tona de manioc şi de 60 litri la tona de trestie de zahăr. Experienţa braziliană în producerea etanolului din trestia de zahăr a trezit interesul şi unor state latino-americane, africane şi asiatice, care cultivă această plantă. De altfel, criza petrolului din 1973-1974 a determinat un interes deosebit pentru producerea de alcool din plante alcooligene în numeroase ţări, cum ar fi: Japonia, Franţa, India, Filipine, Australia, Papua-Noua Guinee etc, în care s-au construit în anii 1980 uzine de producere de alcool-carburant din biomasă. În Franţa, de exemplu, atenţia a fost îndreptată spre utilizarea în acest scop a trestiei de zahăr (în insula Reunion), dar şi a sfeclei de zahăr şi a napului (pe continent). Napul a apărut a fi o plantă alcooligenă de perspectivă, capabilă să ofere o producţie de 50-60 tone de tuberculi la hectar, inulina din aceştia asigurând obţinerea prin hidroliză şi fermentaţie a unei cantităţi de cca 30-50 hectolitri amestec acetonă-butanol, (SASSON, 1988). În SUA, cultura nr.1 este porumbul, din care se obţine amidon la un preţ de sub 15 cenţi/kg, fapt ce a dus şi la alte utilizări ale acestuia decât în alimentaţie. Amidonul extras din cca 14 milioane tone de porumb se foloseşte în procese de fermentaţie pentru producerea unei cantităţi de 1 milion de galoane SUA (1 galon=3,78 l) de etanol combustibil, (OHLROGGE şi CHRISPEELS, 2003).

De perspectivă apar şi biotehnologiile care au în vedere transformarea în combustibili lichizi şi gazoşi a deşeurilor celulozice şi hemicelulozice cu ajutorul unor microorganisme ce conţin enzime de hidroliză adecvate. În ţările care au o industrie puternică de celuloză şi hârtie s-au pus la punct şi tehnologii pentru producerea de alcool din deşeurile de natură celulozică, rumeguş şi leşii sulfitice. Prin utilizarea

Scanned with OKEN Scanner

ciupercii *Trichoderma reesii*, firma Bio Fuel Industries din SUA produce zilnic o cantitate de 50 tone etanol din degradarea enzimatică a cca 250 tone de deşeuri celulozice. Tot în SUA, Institutul de cercetări pentru energia solară a pus la punct biotehnologii de producere a etanolului şi acidului lactic din hemicelulozele prezente în paie şi coceni sau în lemnul de foioase, prin fermentaţie cu bacteria anaerobă *Thermobacterioides saccharolyticum*. Se apreciază că din 200 mii tone de deşeuri din paie şi lemn se pot obţine cca 50 mii tone etanol şi 22 mii tone de alte substanţe (furfurol, fenol, crezol) necesare în industria chimică, (MILICĂ, 1999). Costurile pentru producerea de etanol din deşeuri lemnoase s-ar putea reduce prin utilizarea unor tulpini termofile din genul *Clostridium*.

O sursă importantă de fitomasă o constituie plantele acvatice. Dacă în cazul unor plante de uscat (terestre) utilizabile ca sursă de energie, se pune problema scoaterii din circuitul agricol a unor suprafeţe de teren, în cazul plantelor acvatice, această problemă dispare. Dacă ţinem cont că mările şi oceanele ocupă cca 3/4 din suprafaţa Pământului, că ele conţin o cantitate enormă de fitomasă (constituită în special de alge), care este încă foarte puţin valorificată, că în caz de nevoie s-ar putea recurge chiar la cultivarea unor suprafeţe marine etc, ne putem face o idee despre potenţialul imens pe care îl oferă mediul acvatic în privinţa aportului de biomasă. Această biomasă ar putea fi folosită atât în scop energetic, cât şi pentru obţinerea de proteine, pigmenţi şi alte substanţe utile omului. Totodată, s-au identificat surse de fitomasă de perspectivă pentru cultura în apele dulci cum ar fi: lintiţa *(Lemna minor)*, zambila de apă *(Eichornia crassipes)* şi salata de apă *(Pistia stratiotes*). Zambila de apă, de exemplu, se dezvoltă bine în apele industriale, manifestând şi o capacitate de epurare remarcabilă, iar în condiţii optime de temperatură şi de nutriţie poate atinge o biomasă de cca 300 tone substanţă uscată la hectar pe an, echivalentă cu 120 tone de petrol, (CRĂCIUN, 1986). Această specie a fost testată de către M. GODEANU şi în ţara noastră, fiind cultivată în ape calde, ape reziduale, unele iazuri, în sistem piramidă etc, constatându-se că producţia de masă proaspătă poate atinge într-un interval de 6 luni cantitatea de 500 -1000 tone/ha. Biomasa obţinută poate fi utilizată şi în furajarea animalelor sau în obţinerea de proteine, pigmenţi şi alte substanţe utile. Prin conţinutul ei ridicat în K^+, a contribuit la combaterea unor gastroenterite apărute în complexele

Scanned with OKEN Scanner

porcine unde a fost administrată în hrană. Şi salata de apă are un ritm accelerat de creştere, dublându-şi biomasa la fiecare 5-6 zile, având totodată capacitatea de a acumula metalele grele din apă. Diversele resturi vegetale, ca şi fitomasa realizată pe diverse căi, poate fi supusă unui proces de fermentaţie metanică, cu obţinerea de biogaz.

6.2. Producerea de combustibili cu ajutorul plantelor

Unele plante au capacitatea de a sintetiza substanţe care pot fi utilizate direct drept combustibili, cum ar fi unele hidrocarburi, hidrogen, uleiuri vegetale. Coniferele produc răşini, alte plante cum ar fi arborele de cauciuc (*Hevea brasiliensis),* ficusul (*Ficus elastica)*, plantele din familia *Euphorbiaceae* produc un latex specific. Atât în răşini cât şi în acest latex se găsesc hidrocarburi care ar putea fi utilizate în scop energetic. De altfel, până la obţinerea cauciucului sintetic, industria de automobile a folosit cauciucul natural produs din latexul unor plante. Pentru obţinerea de hidrocarburi din plante atenţia a fost îndreptată spre unele *Euphorbiaceae* care conţin în latexul lor poliizopreni. Aceste plante prezintă avantajul că pot fi cultivate în zone aride, improprii altor culturi, astfel încât cultivarea lor nu pune problema reducerii suprafeţelor destinate altor plante de importanţă alimentară, textilă etc. În anii 1970 s-au făcut şi unele estimări asupra randamentului în producerea de către aceste plante a unor hidrocarburi direct utilizabile, calculele avansând cifre de 3-15 barili/ha/an, la un preţ de 3-10 USD/baril, dar şi valori mai scăzute de 2 barili/ha/an, la un preţ de 20 USD/baril, (L. ATANASIU).

Dintre *Euphorbiaceae*, specialiştii francezi s-au oprit asupra speciei *Euphorbia characias,* care creşte spontan în zona mediteraneană şi care conţine în latex cca 25% cauciuc.

Unele laboratoare de profil din Franţa au în atenţie şi o algă unicelulară brună – *Bothryococcus braunii*, care acumulează în pereţii celulari, în faza de creştere hidrocarburi, într-o cantitate care poate atinge 15-75% din biomasa uscată. Alga prezintă două forme: una de culoare verde – care sintetizează hidrocarburi liniare cu 25-31 atomi de carbon în moleculă, sărace în legături duble şi o formă roşie – care conţine hidrocarburi cu 31-38 atomi de carbon în moleculă şi bogate în legături duble. Au fost deja izolate unele tulpini de *Bothryococcus braunii* care în condiţii de laborator îşi dublau la fiecare două zile biomasa şi care conţineau cca 35% hidrocarburi din substanţa uscată. Pentru exploatarea

Scanned with OKEN Scanner

la scară industrială a acestei alge sunt încă de pus la punct unele aspecte referitoare la condiţiile optime de cultivare pentru realizarea unor producţii ridicate, la rolul unor bacterii cu care se asociază alga în producerea hidrocarburilor etc. Se apreciază de asemenea că studiile complexe asupra acestei alge ar putea aduce şi unele informaţii privitoare la geneza petrolului, (SASSON, 1988).

Între speciile producătoare directe de combustibili sunt incluse şi plantele oleaginoase. Dacă cele din zona temperată, cum ar fi floarea soarelui şi rapiţa au o producţie slabă de ulei la hectar (1-1,7 tone/ha), cele din zona tropicală, cum ar fi palmierul de ulei furnizează o producţie ridicată de ulei (5-6 tone/ha). Producţia anuală de ulei vegetal în lume este apreciată la peste 100 milioane tone şi evaluată la 50 miliarde de dolari SUA. În jur de 30% din uleiurile vegetale sunt utilizate în alte scopuri decât în alimentaţie, cum ar fi producerea de săpunuri, detergenţi, lubrefianţi, coloranţi şi polimeri. Operaţiile de inginerie genetică vizează însăşi schimbarea compoziţiei uleiului din seminţe. Un prim succes de acest gen a fost raportat în cazul rapiţei pentru producerea de ulei bogat în acid lauric (compus bine reprezentat în uleiurile vegetale tropicale, dar nu şi în cele din zona temperată). Cea mai mare cantitate de ulei vegetal în lume se obţine însă din soia (cca 70% din uleiul consumat). Uleiul de soia este bogat în acizi graşi polinesaturaţi (acizii linoleic şi linolenic), care-l fac nestabil şi uşor oxidabil (de aceea devine rânced). Prin operaţii de inginerie genetică s-a reuşit blocarea genei pentru enzima care converteşte acidul oleic (18:1) la acid linoleic (18:2), fapt ce a dus la eliminarea aproape completă a acizilor polinesaturaţi din uleiul de soia. În acest fel, noul ulei de soia conţine cca 85% acid oleic, având o compoziţie asemănătoare cu uleiul de măsline. Stabilitatea la oxidare a noului ulei de soia este de peste 10 ori mai mare decât a celor mai multe uleiuri vegetale, ceea ce-l face interesant în substituirea uleiului mineral în unele aplicaţii, (OHLROGGE şi CHRISPEELS, 2003).

În atenţia specialiştilor se află şi specia *Euphorbia lathirus*, care prezintă în latex un conţinut scăzut de cauciuc, dar unul ridicat în răşini, iar seminţele conţin până la 50% ulei, (L. ATANASIU, 1990).

Odată cu elucidarea procesului de fotosinteză a apărut ideea de identificare a unui sistem fotochimic stabil de producere a hidrogenului prin fotoliza apei. Hidrogenul ar fi o sursă importantă şi ideală de energie

Scanned with OKEN Scanner

deoarece: apa ca "materie primă" există din abundență pe Pământ, energia luminoasă (solară) este nelimitată, hidrogenul are o putere calorică înaltă, prin ardere nu produce poluanți, poate fi depozitat fără probleme, procesul de producere a lui are loc la temperaturi obișnuite etc, (SASSON, 1988).

Potrivit ciclului lui CALVIN, în faza de lumină a procesului de fotosinteză are loc fotoliza apei cu eliminarea de oxigen molecular, iar protonii de H^+ şi electronii produşi sunt preluați de *ferredoxină* (transportor de electroni), care trece din forma ei oxidată în formă redusă, iar în faza de întuneric are loc cedarea celor din urmă (într-un şir de reacții specifice de reducere) la CO_2, cu formarea de glucide (CH_2O), feredoxina revenind la forma oxidată. În urma fotosintezei la plante se produc deci glucide şi oxigen molecular. S-a constatat, pe la începutul anilor 1970, că sistemul format din cloroplaste de spanac, *hidrogenază* extrasă din *Clostridium sp.* şi feredoxină, era capabil ca în prezența luminii să producă hidrogen. Unele bacterii, alge albastre şi verzi conțin deci hidrogenaze, enzime sensibile la prezența oxigenului, capabile să determine formarea de hidrogen molecular în fotosinteză. Se pune problema identificării unor hidrogenaze mai puțin sensibile la oxigen, sau a unor metode de captare a oxigenului eliberat din fotoliza apei.

CALVIN (citat de SASSON, 1988) a imaginat procedee de realizare *in vitro* a fotosintezei pentru producerea hidrogenului, de fotoliză artificială a apei, în care în prima fază să se obțină oxigen şi un transportor de electroni redus, urmând ca apoi să fie eliberat hidrogenul din transportorul redus. Fotochimiştii au elaborat şi alte procedee de producere a hidrogenului prin folosirea pigmenților fotosensibili şi a unui donor artificial de electroni în locul apei, sau fotoliza apei cu ajutorul luminii vizibile în prezența unor combinații formate din compuşi de ruteniu şi alți catalizatori.

O altă pistă de cercetare în producerea de energie pe cale biotehnologică este utilizarea pigmentului purpuriu – *bacteriorodopsina* din bacteria halofilă *Halobacterium halobium*. Această bacterie poate fi cultivată în bălțile sărate cu adâncime mică şi în apa de mare. Bacteriorodopsina se află în membrana celulară şi în prezența luminii solare se comportă ca o pompă de protoni, asigurând transferul protonilor de o parte şi de alta a membranei. Se stabileşte un gradient de concentrație (o diferență de potențial electric), protonii fiind mai

Scanned with OKEN Scanner

concentrați spre interiorul celulei şi mai puțin concentrați spre exterior. Deşi folosirea bacteriorodopsinei în sisteme artificiale de utilizare a luminii solare s-a dovedit mai puțin eficientă comparativ cu unii captatori fizici de exemplu, este posibil ca pe viitor să se identifice metode de sporire a acesteia. Promițătoare apare fixarea membranelor purpurii de *Halobacterium halobium* pe suporturi poroase, impregnate în prealabil cu lipide (PRENTIS, citat de SASSON, 1988), care pot asigura o anumită orientare a moleculelor de bacteriorodopsină şi pomparea protonilor în aceeaşi direcție.

6.3. Producerea de biogaz

Potrivit informațiilor furnizate de SASSON (1988) transformarea biomasei în biogaz, în special metan, a fost observat încă acum mai bine de două secole de către VOLTA, care în 1776 descoperea metanul în gazul eliberat din mlaştini. Gazul de mlaştini, cum mai este denumit, este constituit din cca 65% metan, 30% dioxid de carbon, 1% hidrogen sulfurat, precum şi din cantități mici de azot, oxigen, hidrogen, monoxid de carbon. Producerea de energie din biogazul provenit din fermentarea în reactoare de diverse tipuri a deşeurilor organice (deşeuri agricole, menajere, din industria alimentară, gunoi de grajd, resturi lemnoase din exploatările silvice etc) reprezintă o preocupare importantă în unele țări ca India, China, Filipine etc, pentru acoperirea nevoilor energetice locale (în special în mediul rural). După terminarea procesului de fermentație, nămolul rezultat în instalațiile de fermentare poate fi utilizat ca îngrăşământ în agricultură.

Metanul rezultă în urma unui proces de fermentație anaerobă a biomasei organice, în care electronii eliberați din substratul organic ajung în final la dioxidul de carbon care va fi redus la metan. Primul fermentator pentru producerea de biogaz a fost construit în 1895 de către CAMERON, „materia primă" folosită fiind nămolul organic rezultat din decantarea apelor reziduale , biogazul obținut fiind utilizat la iluminarea oraşului Exeter din Anglia, (MILICĂ, 1999).

În procesul de producere a biogazului intervin 3 grupe de bacterii:

- bacterii care asigură hidroliza substraturilor organice complexe în substanțe mai simple, în special acizi organici ca: acidul butiric, propionic şi lactic;

Scanned with OKEN Scanner

- bacterii acetogene, care intervin apoi în degradarea acestor acizi la acid acetic, dioxid de carbon şi hidrogen;
- bacterii metanogene, care asigură reducerea dioxidului de carbon, consumând astfel hidrogenul din mediul de reacţie, care altfel ar inhiba activitatea bacteriilor din grupa B. Din această ultimă grupă fac parte bacterii din genurile *Methanobacterium, Methanosarcina etc.*

S-a constatat totodată că şi o serie de compuşi aromatici pot fi trasformaţi mai întâi la acetat şi apoi, prin intervenţia unor bacterii metanogene ca *Methanobacterium formicicum şi Methanospirillum hungati,* la metan, într-un şir de reacţii prezentate mai jos (după SASSON, 1988):

$$4\ C_6H_5COOH + 24\ H_2O \rightarrow 12\ CH_3COOH + 4\ HCOOH + 8\ H_2O$$

(benzoat) (acetat) (formiat)

$$12\ CH_3COOH \rightarrow 12\ CH_4 + 12\ CO_2$$

$$4\ HCOOH \rightarrow 4\ CO_2 + 4\ H_2$$

$$3\ CO_2 + 12\ H_2 \rightarrow 3\ CH_4 + 6\ HO$$

În final, plecând de la 4 molecule de benzoat, rezultă:

$$4\ C_6H_5COOH + 18\ H_2O \rightarrow 15\ CH_4 + 13\ CO_2$$

În mediul natural, metanobacteriile (consumatoare de hidrogen) sunt asociate cu bacteriile producătoare de hidrogen, în acest fel asigurându-se evitarea acumulării unor concentraţii toxice de hidrogen pentru cele din urmă. Au fost totodată selecţionate tulpini bacteriene cu metanogeneză mult mai intensă. Aşa, de exemplu, compania Japoneză Matsushita Electric Industrial a izolat şi cultivat în masă tulpina St_{23} de *Methanobacterium kadomensis*, care realizează metanogeneza doar în 8 zile, faţă de 20 zile în cazul tulpinilor obişnuite.

Producţia de biogaz depinde de o serie de factori ca: tipul de fermentator utilizat, activitatea bacteriilor metanogene, compoziţia substratului de fermentaţie, temperatura şi pH-ul de fermentaţie etc. Tancurile de fermentaţie pot fi realizate din cărămidă, beton, sau din oţel, au formă cilindrică, trebuie să fie etanşe, sunt prevăzute cu o deschidere

Scanned with OKEN Scanner

laterală pe unde se introduce amestecul de fermentare, iar deasupra prezintă un recipient cilindric din oţel (prevăzut cu o serie de canale) care pluteşte pe amestecul de fermentare şi care împiedică accesul aerului în fermentator şi asigură recoltarea gazului format. Procesul de fermentare se desfăşoară optim la un pH apropiat de neutru (pH=6,0-8,0) şi la o temperatură de 30-40^{0}C pentru microorganismele mezofile şi de 50-60^{0}C pentru cele termofile. pH-ul acid inhibă activitatea bacteriilor metanogene şi pentru ameliorarea lui se adaugă oxid de calciu. Pentru a se realiza o temperatură mai ridicată, fermentatoarele sunt îngropate în sol, iar în cazul climei reci ele pot fi încălzite cu căldura furnizată de compostul din deşeuri agricole. În fermentator trebuie să se asigure de asemenea un anumit raport carbon/azot (30/1), pentru a se evita producerea de amoniac (în cazul excesului de azot), care inhibă creşterea şi înmulţirea bacteriilor. Corectarea acestui raport în favoarea carbonului se realizează prin introducerea în fermentator de paie sau deşeuri din lemn, (SASSON, 1988). Se recomandă de asemenea fragmentarea deşeurilor solide şi chiar agitarea amestecului de fermentaţie pentru optimizarea metanogenezei. La amestecul de fermentaţie se adaugă apă, într-un raport de 1/1 cu deşeurile solide utilizate. Amestecul obţinut este însămânţat cu culturi de bacterii acetogene şi metanogene. Perioada de macerare a amestecului de fermentaţie depinde de compoziţia lui: în cazul dejecţiilor din crescătoriile de porci durează cca 10 zile, a celor de bovine şi păsări – 20 zile etc. Este necesar ca amestecul de fermentaţie să nu conţină antibiotice, detergenţi, metale grele, pesticide, care ar putea influenţa sensibil procesele de fermentaţie. Producţia zilnică de biogaz pe m^3 de fermentator a fost estimată la 0,9-1,4 m^3 pentru nămolul provenit de la staţiile de epurare, de 1,5-12 m^3 pentru apele reziduale şi de 3-7 m^3 în cazul deşeurilor menajere supuse fermentaţiei, (MILICĂ, 1999). După unele aprecieri, dacă nămolurile orăşeneşti şi deşeurile agricole din SUA ar fi convertite în biogaz, acesta ar asigura peste 8% din nevoile energetice ale ţării, contribuind totodată substanţial şi la protecţia mediului.

În anii `70-80 ai secolului trecut s-a acordat o atenţie foarte mare valorificării acestei forme de energie (o adevărată modă) în toată lumea, dar mai cu seamă în ţările asiatice. În India era prevăzut ca în perioada 1980-1984 să se realizeze nu mai puţin de 1 milion de fermentatoare, ceea ce reprezenta doar 5% din posibilităţile oferite doar din bălegarul de

Scanned with OKEN Scanner

bovine, acţiune sprijinită de Guvern cu o sumă de 55 milioane dolari. În China, această acţiune era şi mai intensă, instituindu-se un program naţional biogaz, potrivit căruia în anul 1985 erau prevăzute să funcţioneze un număr impresionat de fermentatoare biogaz (70 milioane), care să asigure în mare măsură nevoile energetice din zonele rurale. Programul era sprijinit de guvernul chinez, prin acordarea de împrumuturi cu dobândă mică, pentru construirea instalaţiilor de producere a biogazului. Interes pentru această formă de energie a existat şi în ţări dezvoltate, precum Israelul. În 1982 intra în funcţiune la Ashkelon (în Galileea de Sus) o uzină de mare capacitate pentru producerea de biogaz şi se considera oportună construirea a cca 460 astfel de uzine în toată ţara. Biometanogeneza a revenit în actualitate în aceeaşi perioadă şi în unele ţări Occidentale ca Franţa, după ce această modalitate de a produce energia fusese abandonată după al doilea război mondial, (SASSON, 1988).

Nu dispunem de informaţii recente privitoare la situaţia actuală a exploatării acestei forme de energie, dar nu încape îndoială că ea ar trebui să se bucure de acelaşi interes, având în vedere faptul că poate contribui la soluţionarea a două probleme importante: satisfacerea unor nevoi energetice pe plan local şi igienizarea mediului.

7. BIOTEHNOLOGII PENTRU PROTECŢIA MEDIULUI

7.1. Poluarea mediului – componentă a civilizaţiei umane

Creşterea demografică, aproape explozivă, înregistrată mai cu seamă în ultimul secol, corelată cu ridicarea continuă a standardului de viaţă al oamenilor, a determinat implicit creşterea nevoilor de alimente, energie, locuinţe şi artere de circulaţie, bunuri de larg consum etc. Satisfacerea acestora a impus defrişarea unor suprafeţe tot mai mari de pădure pentru extinderea culturilor agricole sau în alte scopuri, dezvoltarea unei agriculturi intensive, identificarea şi exploatarea tot mai intensă a rezervelor de minerale şi combustibili fosili din scoarţa pământului, dezvoltarea şi diversificarea industriei, crearea de lacuri artificiale pentru exploatare energetică etc. Toate aceste activităţi umane au avut un impact nedorit, uneori grav sau cu consecinţe imprevizibile

Scanned with OKEN Scanner

asupra mediului natural. Poluarea mediului, sub diverse forme şi în diverse grade, a devenit un "simbol" al civilizaţiei umane a secolului al XX-lea, în special. În ciuda "semnalelor de alarmă" trase de oamenii de ştiinţă, a eforturilor organizaţiilor ecologiste din toată lumea, a întâlnirilor mondiale periodice care au drept scop grija faţă de mediul ambiant şi impunerea unor măsuri pentru diminuarea efectelor negative ale activităţilor umane asupra acestuia, deteriorarea mediului natural continuă şi se accentuează, fie din lipsă de resurse financiare pentru protecţia lui, fie din dorinţa obţinerii de câştiguri tot mai mari, fie din lipsa unor legi severe în acest sens, iar în unele zone ale lumii poate chiar din neştiinţă. Marile oraşe şi metropole, care constituie adeseori şi zonele cu cea mai dezvoltată industrie, ridică probleme deosebite pentru asigurarea unui mediu normal de viaţă, care să nu pună în pericol însăşi sănătatea locuitorilor lor.

7.1.1. Poluarea atmosferei

De-a lungul istoriei Pământului poluarea naturală a atmosferei acestuia s-a produs doar prin fenomenele de vulcanism, prin căderea unor meteoriţi de mari dimensiuni care au putut antrena în aer cantităţi importante de pulberi, prin erupţia naturală a unor "pungi" de gaze şi petrol, prin producerea unor incendii naturale de proporţii etc. La aceste surse, omul a adăugat nenumărate altele prin dezvoltarea industriei extractive şi prelucrătoare. Poluanţii atmosferici sunt reprezentaţi de gaze (cca 90% din emisiile în atmosferă) şi de diverse particule solide (cca 10%). Dintre poluanţii gazoşi, cei mai importanţi sunt: monoxidul de carbon, dioxidul de carbon, oxizii de sulf şi azot, hidrocarburile terpenice, hidrogenul sulfurat, florurile, clorfluorocarbonaţii etc. În categoria particulelor solide intră pulberile provenite din vulcanism şi eroziunea eoliană, din incendii, din arderea combustibililor fosili în termocentrale, din arderea lemnului, din industria materialelor de construcţie, siderurgică şi chimică etc. Numai din arderea combustibililor fosili (în special a cărbunelui) în scop energetic se eliberează în atmosferă cantităţi de CO_2 apreciate la milioane tone/an care, alături de clorfluorocarbon, contribuie la intensificarea alarmantă a "efectului de seră", oxizi de azot şi dioxid de sulf (datorită cărora se produc ploi acide).Termocentralele antrenează totodată în atmosferă cenuşă, zgură, gudroane, funingine. Fabricile de acid sulfuric, de celuloză şi hârtie,

Scanned with OKEN Scanner

topitoriile de minereuri neferoase etc, eliberează în atmosferă cantităţi mari de oxizi de sulf. Uzinele de îngrăşăminte cu azot, pentru producerea azotului lichid sau a acidului azotic poluează atmosfera cu oxizi de azot. Oţelăriile, cocseriile, fabricile de fontă, de celuloză, de producere a vâscozei etc, poluează aerul cu mari cantităţi de hidrogen sulfurat. Fabricile de ciment eliberează în atmosferă diverse pulberi. Uzinele care produc solvenţi organici, fibre sintetice, pesticide, celuloză şi hârtie etc, eliberează în atmosferă clor. Alături de industrie, în poluarea atmosferei un rol important revine şi autovehiculelor, a căror număr a crescut într-un ritm ameţitor şi care prin arderea carburanţilor eliberează cantităţi mari de monoxid de carbon, compuşi cu plumb folosiţi ca aditivi.

Poluanţii atmosferici afectează puternic fiziologia plantelor. Oxizii de sulf şi azot produc pete şi leziuni necrotice pe frunzele plantelor, care pot duce la îngălbenirea şi căderea lor, provocând în situaţii mai grave însăşi uscarea plantelor. Cele mai sensibile la poluanţii atmosferici sunt ciupercile şi lichenii, apoi coniferele şi plantele ierboase, arborii cu frunze căzătoare fiind mai rezistenţi.

Din cauza fumului, pulberilor şi gazelor aruncate în atmosferă, unele oraşe puternic industrializate au ajuns să fie frecvent acoperite de o ceaţă densă, constituită din pulberi, fum, vapori de apă, acid sulfuric şi azotic, oxizi de sulf şi azot, hidrocarburi volatile, cunoscută sub numele de *smog* (cele mai "faimoase" fiind smogurile londonez şi californian). Acest smog poate afecta doar zona în care se formează, dar poate fi purtat de vânt la mari distanţe şi să cadă pe solul şi vegetaţia din zone îndepărtate de locul unde s-a produs. Acest smog şi ploile acide care pot fi generate din el afectează grav calitatea vieţii şi sănătatea omului, dar şi vegetaţia anumitor zone. Ploile acide au un efect nefast asupra pădurilor, cărora le produc pagube importante, care ajung uneori până la 50% din fondul forestier. Aceste ploi acţionează negativ nu numai asupra coroanei arborilor ci şi a rădăcinilor, apa acidă care ajunge în sol mobilizând ionii toxici de Al^{3+}.

În zonele reci, smogul acid provoacă la animalele terestre şi la om o serie de boli respiratorii ca bronşite, astm bronşic, emfizem pulmonar etc, iar în zonele calde, smogul oxidant provoacă o serie de afecţiuni oculare de tipul iritaţiilor, conjunctivitelor, infecţiilor oculare. Poluanţii atmosferici produc de asemenea tulburări ale aparatului cardio-vascular şi modificări ale formulei sanguine, etc. Ploile acide au efecte negative

Scanned with OKEN Scanner

chiar şi atunci când cad deasupra unor lacuri si cursuri de apă, afectând viaţa unor specii acvatice mai sensibile la poluanţii de orice fel, cum ar de exemplu păstrăvul şi somonul. S-a constatat de asemenea că ploile acide, prin efectul lor coroziv, distrug lent dar sigur o serie de monumente de artă de valoare inestimabilă, după secole şi chiar milenii de când au fost construite.

Poluarea atmosferică pune în pericol şi stratul de ozon situat în stratosferă (care atinge altitudinea maximă de 18 km în zona polilor şi 30 km în zona ecuatorială) şi care are un rol esenţial în protecţia vieţii pe pământ de acţiunea radiaţiilor UV. Se apreciază că în ultimii 50 de ani, datorită eliberării în atmosferă a freonilor, a oxizilor de azot şi clorfluorocarbonului, stratul de ozon din stratosferă s-a redus cu cca 30%, iar în zona Antarcticii chiar cu 50%. Modificările fizico-chimice provocate de poluarea atmosferei pământului determină schimbări ale coeficienţilor de reflexie şi absorbţie ale atmosferei, o diminuare a intensităţii fluxului solar, cu consecinţe asupra climei la nivel global. Se pare că există o legătură între concentraţia de dioxid de carbon în atmosferă, factorii atmosferici şi schimbările climatice, (PRICOPE, 2001). În ultimii 150 de ani s-a înregistrat o încălzire a planetei, la care a contribuit semnificativ, prin "efectul de seră", creşterea cantităţii de dioxid de carbon din atmosfera terestră.

În ultimii 60 de ani, ca urmare a utilizării energiei nucleare în scop militar şi al producerii de energie electrică, la sursele să le spunem "tradiţionale" de poluare, s-a mai adăugat una extrem de periculoasă şi cu efecte pe termen lung, *poluarea radioactivă*. În urma exploziilor atomice şi accidentelor produse la reactorii nucleari ai centralelor atomice sunt aruncate în atmosferă cantităţi importante de pulberi şi radionuclizi (cca 20), printre care un impact deosebit asupra sănătăţii omului şi animalelor au Sr^{90}, Cs^{137}, I^{131}.

Evident că toţi poluanţii atmosferici menţionaţi revin, mai devreme sau mai târziu pe pământ, ca atare sau sub forma unor combinaţii (cu apa din atmosferă sau între ei), contribuind la poluarea solului, a apelor de suprafaţă şi subterane. La poluarea acestor medii de viaţă (solul şi apa) participă şi îngrăşămintele minerale şi pesticidele utilizate în agricultură, diversele deşeuri menajere, industriale şi agricole, detergenţii, scurgerile accidentale ale unor substanţe provenite din industria chimică, din sterilul de la arderea cărbunilor şi din alte industrii,

Scanned with OKEN Scanner

etc. Numai din arderea cărbunelui fosil, de exemplu, rezultă cantități mari de metale grele foarte toxice (arseniu, cadmiu, plumb, vanadiu, mercur etc) şi sunt concentrate o serie de elemente radioactive (uraniu, radiu, thoriu) înglobate în cărbune.

7.1.2. Poluarea solului

Creşterea demografică şi industrializarea puternică înregistrate mai cu seamă în ultimul secol au avut un impact nedorit şi asupra solului, suport sau mediu de viață pentru numeroase organisme. Defrişările masive efectuate de om atât pentru nevoia de lemn, cât şi pentru extinderea terenurilor agricole, a zonelor de locuit sau a platformelor industriale, au favorizat fenomenele de eroziune a solului şi alunecările de teren, cu degradarea solului din zonele respective. Arătăm anterior că poluanții de natură diversă aruncați în atmosferă de către om, mai ales în urma activităților industriale, ajung în final, sub o formă sau alta pe Pământ, inclusiv pe sol. Solul este de altfel, şi un intermediar între atmosferă şi hidrosferă pentru poluanți. Poluarea solului are numeroase surse, dintre care menționăm:

- deşeuri agricole, silvice şi menajere, dejecții animale şi umane;
- fertilizanți ai solului şi pesticide utilizate în agricultură;
- holde de steril rezultate din industria energetică şi chimică;
- poluarea cu petrol şi hidrocarburi în urma erupției unor sonde, accidentelor la magistralele de transport ale petrolului şi combustibililor;
- poluarea cu deşeuri şi reziduuri anorganice (metale grele, compuşi cu plumb, acizi, baze, diverse săruri etc) provenite din industria extractivă, industria chimică;
- poluarea datorată lucrărilor de decopertare, de construcție, de la balastiere, exploatări miniere;
- contaminarea solului cu agenți patogeni datorită materiilor organice depozitate la întâmplare sau neadecvat, care favorizează proliferarea acestora etc.

În reziduurile rezultate din arderea cărbunelui fosil în termocentrale, în haldele de steril din industria extractivă, în apele industriale şi menajere utilizate la irigarea culturilor agricole, în nămolurile obținute în stațiile de epurare a apelor, în gazele de eşapament ale autovehiculelor, în pesticidele folosite în agricultură etc, se găsesc o

Scanned with OKEN Scanner

serie de metale grele ca plumbul, zincul, cadmiul, cuprul, mercurul şi altele, extrem de toxice pentru viaţă. Fie direct, fie indirect prin intermediul apei, sub formă de ioni sau substanţe complexe, ele pot ajunge în sol unde produc dezechilibre ale proceselor fizice, chimice şi biologice din acesta. Metalele grele se acumulează în biomasa vegetală şi prin consumul acesteia de către animale şi om, pot determina dereglări metabolice, fenomene de intoxicare etc, extrem de grave pentru sănătatea acestora.

Modernizarea agriculturii şi creşterea continuă a producţiei vegetale, s-au realizat nu numai prin izolarea unor genotipuri de plante mai valoroase, ci şi prin folosirea pe scară largă a fertilizanţilor şi pesticidelor. Cu fiecare recoltă de plante se extrag din sol cantităţi importante ale unor elemente minerale (azot, fosfor, potasiu, calciu, magneziu, etc), care trebuie administrate artificial pentru refacerea productivităţii solului. Se apreciază că în ultimii 50 de ani, cantităţile de îngrăşăminte folosite în agricultură (sub formă de azotat de amoniu, calciu şi potasiu, uree, superfosfaţi, fosfat dublu de sodiu şi potasiu etc) au crescut de peste 20 de ori. Deoarece administrarea acestor fertilizanţi se face cel mai adesea fără a se ţine seama de cantitatea de elemente minerale existentă în sol, se poate ajunge la situaţii de excedent al acestora în sol şi la antrenarea lor, prin intermediul precipitaţiilor, în apele freatice şi de suprafaţă. Totodată, datorită unei purificări insuficiente a acestor fertilizanţi în procesele de fabricaţie, ei pot conţine şi o serie de metale toxice, dintre cele prezentate anterior. Excesul unor substanţe minerale în sol poate determina perturbarea ciclului biogeochimic al elementelor biogene din sol.

Pesticidele folosite în agricultură (insecticide, fungicide, erbicide) au un impact negativ şi mai mare decât fertilizanţii în privinţa perturbării unor echilibre ecologice şi a sănătăţii animalelor şi omului. Eficacitatea lor în combaterea bolilor, dăunătorilor şi buruienilor care invadează culturile agricole, ca şi economiile de forţă de muncă şi sporurile de recoltă realizate prin administrarea lor, au făcut ca gama pesticidelor să se diversifice continuu, iar folosirea lor să fie tot mai extinsă. Pesticidele au o anumită "perioadă de viaţă", adică sunt active un anumit timp, după care se degradează, perioadă care depinde de caracteristicile lor fizico-chimice, dar şi de factori de mediu. Pesticidele se folosesc pe suprafeţe foarte întinse şi au un nivel ridicat de remanenţă în sol. Tratamentele cu

Scanned with OKEN Scanner

pesticide determină reducerea biodiversității unor ecosisteme, reducerea numerică sau chiar dispariția unor specii de animale utile din acestea, proliferarea puternică a unor specii datorită lipsei concurenței la o anumită sursă de hrană sau a eliminării dușmanilor naturali etc, pot influența însăși succesiunea biocenozelor. Efectele pesticidelor se fac simțite nu numai în zonele de administrare, ci și în zone foarte îndepărtate de acestea, unde ajung fie purtate de vânt, fie prin intermediul apelor de suprafață și freatice. Și cum remanența unora din ele se numără în ani și chiar zeci de ani, ele pot influența un timp îndelungat viața în ecosistemele terestre și acvatice în care ajung. Fără îndoială că utilizarea pesticidelor are un impact nedorit asupra echilibrului și sănătății unor ecosisteme și al omului, dificil de estimat pe termen lung. De aceea se înmulțesc „vocile" care reclamă practicarea unei agriculturii ecologice. Din păcate însă, în condițiile în care necesarul de produse alimentare crește datorită sporului demografic, nu se poate evita folosirea în continuare a pesticidelor în agricultură. Progresele din domeniul ingineriei genetice vor contribui cu siguranță la reducerea consumului de pesticide prin transferul de gene de rezistență la boli și dăunători unor plante de cultură importante economic.

O altă sursă de polare a solului o constituie deșeurile agricole, menajere și dejecțiile de la animale. Resturile vegetale și animale provenite din prepararea hranei omului în mediul urban și rural, resturile vegetale provenite din hrana animalelor amestecate frecvent cu dejecții de la animale, diverse ambalaje, obiecte casnice, haine și încălțăminte inutilizabile etc, sunt depozitate necontrolat în gropi de gunoaie naturale și artificiale, sau chiar sunt abandonate la întâmplare, în zone mai puțin circulate, adeseori în apropierea unor cursuri de apă. Aceste depozite improvizate de gunoaie naturale, pe lângă aspectul extrem de inospitalier pe care-l dau zonelor respective și mirosurile extrem de neplăcute degajate, se constituie în focare de proliferare ale unor paraziți și germeni patogeni, care pot fi răspândiți prin intermediul insectelor, șoarecilor, șobolanilor, câinilor și pisicilor care vizitează aceste depozite. Totodată, microorganismele și substanțele chimice provenite din ambalaje sau din procesele de fermentație care au loc în astfel de depozite, pot fi antrenate de către precipitații în apa freatică sau în apele de suprafață.

Din păcate, în țările slab dezvoltate și subdezvoltate economic se practică mai puțin depozitarea controlată a deșeurilor menajere, în gropi

Scanned with OKEN Scanner

special amenajate, impermeabilizate cu argilă şi folie din PVC, la distanţă de aşezările umane. În multe ţări dezvoltate aceste deşeuri sunt sortate, astfel încât unele sunt refolosite, altele incinerate şi numai o parte din ele sunt compostate în depozitele amintite.

La poluarea solului contribuie şi utilizarea dejecţiilor animale ca îngrăşământ în agricultură. Administrarea acestora în cantităţi mari poate determina creşterea cantităţii unor săruri în sol, a unor substanţe folosite la igienizarea padocurilor sau la combaterea insectelor, rozătoarelor etc, care prin intermediul apelor de şiroire pot contamina apele freatice şi de suprafaţă. Totodată, în dejecţiile de la animale sunt prezente o serie de microorganisme patogene pentru om şi animale şi care se pot constitui într-un important risc pentru sănătatea acestora.

7.1.3. Poluarea apelor continentale şi marine

Urbanizarea intensă, industrializarea puternică şi dezvoltarea unei agriculturi mereu mai performante (intensive), mai cu seamă în ultimul secol, au determinat şi un "conflict" tot mai mare al omului cu mediul natural. Apa reprezintă un element fundamental pentru viaţă, dar şi unul de neînlocuit pentru diversele activităţi umane, inclusiv pentru agricultură şi marea industrie. În apă ajung în cele din urmă mulţi dintre poluanţii la care s-a făcut referire anterior. Şi, deşi în ultimele decenii s-au pronunţat tot mai multe "voci" autorizate pentru limitarea fenomenului şi promovarea de tehnologii industriale şi agricole nepoluante, s-a pus la punct un cadru legislativ la nivel naţional (în numeroase ţări) şi mondial, poluarea aerului, solului şi apei rămâne o problemă de nivel planetar, cu care omenirea se va confrunta şi în viitorul previzibil. Grija pentru sănătatea planetei implică costuri foarte ridicate, pe care societatea umană nu este capabilă încă să le acopere şi să le accepte. Nu ne propunem să intrăm în detalii privind poluarea şi epurarea apelor, ci vom puncta doar câteva dintre problemele cu care se confruntă acest domeniu şi soluţiile tehnologice identificate.

Sursele de poluare a apelor datorate activităţilor umane sunt numeroase şi variate, unele din ele fiind deja pomenite. Este vorba de:

- apele reziduale din industria chimică, siderurgică, de celuloză şi hârtie, alimentară etc, ape care conţin cantităţi însemnate de substanţe minerale şi organice;

Scanned with OKEN Scanner

- apele menajere, apele fluviale, cele provenite de la spălătorii etc, ape încărcate cu cantități mari de substanțe organice și minerale, detergenți, microorganisme etc;
- ape reziduale provenite din agricultură (crescătoriile de animale), irigații, apele fluviale drenate de pe suprafețele agricole etc), care au în compoziția lor îngrășăminte minerale, pesticide, amendamente utilizate în agricultură, aluviuni;
- impurificarea apelor se produce și prin ploile care spală haldele de steril, în urma accidentelor produse la depozitele de substanțe și combustibili, erupții ale unor sonde de petrol, accidente la transportul de substanțe și combustibili, în urma viiturilor care antrenează gunoaie și reziduuri menajere din depozite de gunoaie neamenajate sau din gospodăriile oamenilor etc.

Poluarea cu substanțe organice a apelor curgătoare determină funcție și de cantitatea acestora, reducerea conținutului de oxigen dizolvat, mărirea turbidității apei, favorizează proliferarea unor specii de bacterii aerobe, anaerobe și saprofite, a unui număr mare de ciuperci. De asemenea, în funcție de cantitatea de oxigen dizolvat în apă și de gradul de mineralizare a substanțelor organice se dezvoltă și o serie de alge (cianoficee, diatomee, alge verzi, fitoflagelate). În cazul apelor stagnante, poluarea cu substanțe organice poate avea consecințe și mai grave decât în cazul apelor curgătoare, determinând eutrofizarea acestora, accelerarea evoluției spre mlaștini, degradarea lacurilor prin fenomene de distrofizare, (PRICOPE, 2001). Evident că toate aceste modificări ale caracteristicilor fizico-chimice și biologice ale apelor curgătoare și stagnante influențează și fauna (inclusiv ihtiofauna) specifică apelor normale.

Poluarea chimică a apelor este de asemenea un fenomen cu dimensiuni planetare. Dintre poluanții mai importanți menționăm: nitrații proveniți din îngrășămintele cu azot, din arderea combustibililor fosili, din dejecțiile animaliere; fosfații proveniți din îngrășămintele cu fosfor cu care se fertilizează culturile agricole, din detergenții biodegradabili, din apele menajere epurate; pesticidele provenite din tratamentele aplicate în agricultură și silvicultură, din apele reziduale ale fabricilor de profil; metalele grele, despre a căror origine am discutat anterior; hidrocarburile provenite din extracția și prelucrarea petrolului, din

Scanned with OKEN Scanner

transportul prin conducte, auto- şi naval, de la platformele de foraj marin etc.

În funcţie de natura şi concentraţia poluanţilor chimici, ei afectează într-o măsură mai mare sau mai mică viaţa tuturor grupelor de hidrobionţi. Deosebit de sensibili la poluarea chimică sunt peştii, datorită respiraţiei lor branhiale, constituindu-se astfel în buni indicatori biologici ai nivelului de poluare a apelor.

La poluarea biologică şi chimică a apelor de suprafaţă se adaugă poluarea termică şi cea radioactivă. Chiar dacă are proporţii mai reduse, poluarea termică realizată prin deversarea apelor de răcire folosite în industrie (în special în termocentralele şi centralele atomo-electrice) în apele naturale, determină creşterea temperaturii acestora cu cca 5-10^{0}C, fapt ce antrenează diminuarea solubilităţii oxigenului în apă, reducerea concentraţiei azotului şi dioxidului de carbon din apă. Sporirea temperaturii apelor naturale influenţează creşterea şi înmulţirea microorganismelor acvatice, reduce diversitatea fitoplanctonului, modifică succesiunea normală a speciilor fitoplanctonice etc, fenomene care la rândul lor influenţează creşterea, dezvoltarea şi înmulţirea unor specii de nevertebrate şi vertebrate. Pentru unele specii de peşti (salmonide, de exemplu) poluarea termică are efecte grave asupra ritmului de creştere a puietului, consumului lor de hrană, reproducerii, duratei de viaţă etc.

Poluarea radioactivă a apelor este un rezultat mai recent al activităţii umane, dar cu implicaţii majore pe termen lung. O mare parte din radionuclizii proveniţi din exploziile nucleare, din accidentele la reactorii nucleari, din accidentele în transportul combustibilului nuclear sau a deşeurilor radioactive etc, ajunge în mările şi oceanele Pământului, contaminând organismele acvatice vegetale şi animale. O cantitate mare de radionuclizi se acumulează în organismele fitoplanctonice, unele din ele acumulându-i selectiv. Prin consumul de alimente de origine marină, aceşti radionuclizi pot ajunge în final în organismele umane, care vor fi astfel supuse unei iradieri îndelungate.

Sursele de poluare a apei subterane sunt reprezentate de îngrăşămintele chimice şi pesticidele folosite în agricultură, de haldele de steril şi depozitele necontrolate de gunoaie menajere, de bazinele de stocare a dejecţiilor şi apelor uzate din combinatele de creştere a animalelor, de fosele septice unde se depun dejecţii, deşeuri lichide şi

Scanned with OKEN Scanner

solide din gospodăriile oamenilor, de antrenarea de către precipitații în apele freatice a unor substanțe eliberate în urma unor accidente, sau a microorganismelor care se dezvoltă pe deşeuri de natură organică etc.

Apele au o capacitate naturală de autoepurare, la care participă în primul rând hidrobionții şi microorganismele prezente în mediul acvatic. Substanțele organice sunt transformate de către bacteriile aerobe la CO_2, H_2O şi nitrați, iar cele anaerobe la CH_4, H_2S, NH_3 etc. Eficiența procesului de mineralizare depinde de concentrația substanțelor organice, de concentrația oxigenului în apă, de numărul descompunătorilor şi intensitatea proceselor metabolice etc. Reducerea cantității de oxigen sau absența acestuia favorizează activitatea organismelor anaerobe (bacterii, ciuperci filamentoase, ciliate etc), procesele de reducere având însă o eficiență mai scăzută ca cele oxidative. O serie de hidrobionți ca macrofitele acvatice şi organismele planctonice au capacitatea de a acumula o serie de substanțe toxice prezente în apă, iar unele animale pelagice şi bentonice (spongieri, celenterate, viermi, moluşte, crustacei etc) funcționează ca adevărate biofiltre, extrăgând din masa apei impuritățile în suspensie pe care le digeră sau le elimină nedigerate (sub formă de boluri fecale şi pseudofecale), care se depun pe fundul apelor.

Apele menajere şi uzate industrial se caracterizează printr-o serie de proprietăți fizice (turbiditate, culoare, miros, temperatură), chimice (oxidabilitate, conținutul în oxigen dizolvat, consumul chimic şi biochimic de oxigen, conținutul de amoniac, azot organic, nitriți, nitrați, cloruri, sulfuri, acizi volatili, grăsimi, uleiuri, gaze, metale grele etc) şi biologice (prezența virusurilor, fagilor, bacteriilor, ciupercilor, algelor, protozoarelor, rotiferelor, larvelor de insecte etc). Pentru epurarea apelor menajere şi uzate industrial se folosesc o serie de procedee fizice, chimice şi biologice prin care se reduce cantitatea de materii solide, de substanțe organice şi minerale din aceste ape, precum şi încărcătura lor microbiană, până la un nivel care să nu afecteze mediul ambiant şi care să permită reutilizarea lor în diverse (anumite) scopuri. Tratarea acestor ape are loc în stații de epurare unde, funcție de caracteristicile apelor uzate, de debitul acestora, de gradul de epurare, de scopul în care vor fi folosite etc, sunt supuse unei epurări în trepte: primară, secundară, terțiară, (fig. 7.1).

În cadrul primei trepte sunt reținute mecanic o serie de materii grosiere cu ajutorul grătarelor, sitelor, dezintegratoarelor, denisipatoa-

Scanned with OKEN Scanner

relor. Separarea grăsimilor şi uleiurilor se face în bazine speciale prin flotare naturală, acțiune care poate fi intensificată prin insuflarea de aer (în care se adaugă uneori clorul gazos), iar substanțele separate sunt îndepărtate din apă prin jgheaburi şi conducte găurite. Materiile în suspensie se depun în bazinele decantoare, formând nămolul primar, apa limpede fiind evacuată pentru a fi supusă epurării biologice.

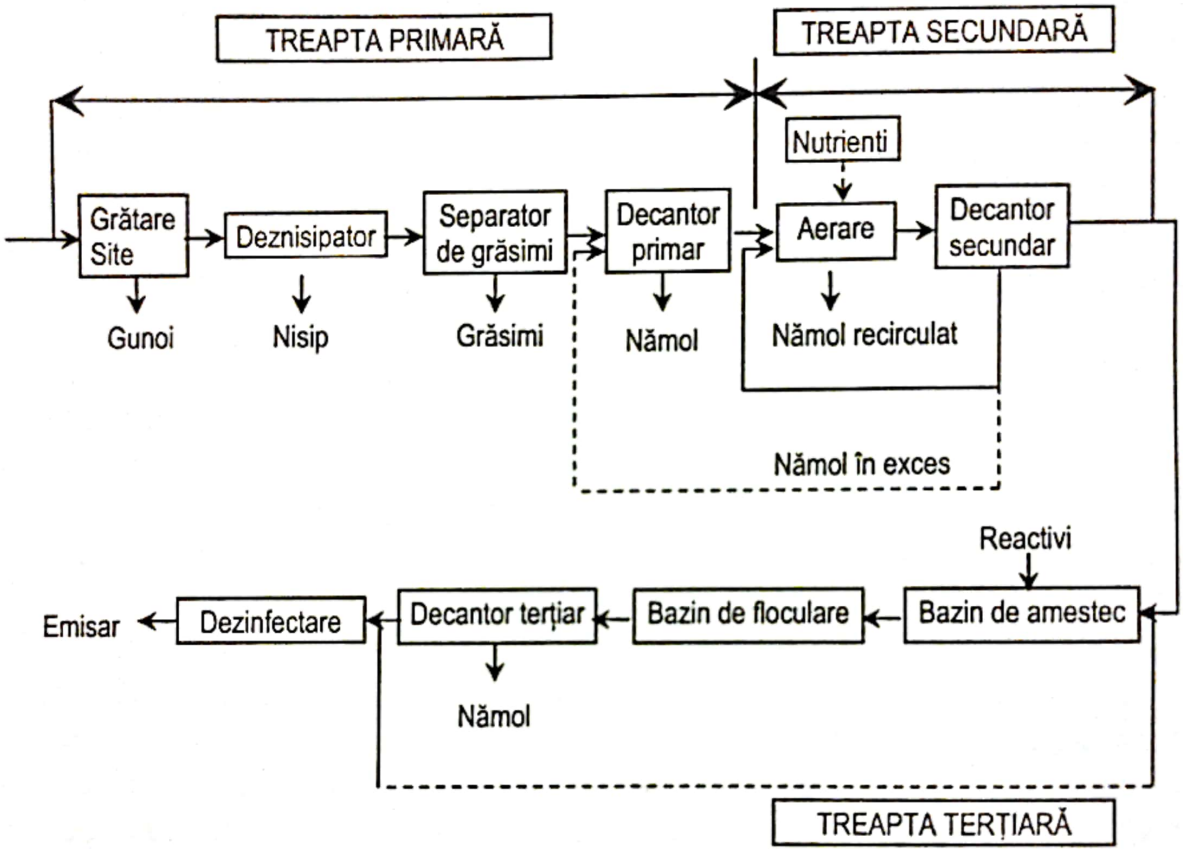


Fig. 7.1. Schema generală de epurare a apelor uzate (după STOIANOVICI şi ROBESCU, 1989)

În cadrul epurării secundare sau biologice, are loc descompunerea cu ajutorul microorganismelor a substanțelor organice (dizolvate sau în stare coloidală) din apa decantată. Epurarea biologică poate fi realizată natural şi artificial. În primul caz, se folosesc câmpurile de irigare şi filtrare, sau iazurile de oxidare şi stabilizare. Utilizarea câmpurilor de irigare şi filtrare este indicată pentru apele uzate provenite din localități mai mici (care nu depăşesc 10-15 mii de locuitori). Filtrul este constituit de însuşi solul pe care este împrăştiată apa uzată, substanțele organice

Scanned with OKEN Scanner

fiind descompuse de către microorganismele aerobe din sol. Terenurile pe care se amenajează câmpurile de filtrare trebuie să dispună de soluri permeabile. Irigarea cu ape uzate nu este recomandată pentru culturile de legume care se consumă în stare crudă. Împrăştierea apei pe sol se poate face prin brazde, prin inundare, prin aspersiune şi la suprafaţă, (NEGULESCU şi SECARĂ, 1976). Iazurile de oxidare şi stabilizare au adâncime mică şi întindere mare, astfel încât suprafaţa de contact dintre apă şi aer să fie cât mai mare. Câmpurile de irigare şi filtrare sunt inutilizabile însă iarna şi într-un regim normal sau excesiv al precipitaţiilor.

Din acest motiv şi nu numai, este mai larg folosită epurarea biologică artificială, care poate fi realizată cu ajutorul filtrelor biologice, în bazine cu nămol activ, în bazine cu regenerarea nămolului, în şanţuri oxidante etc. Comparativ cu câmpurile de irigare şi filtrare, filtrele biologice ocupă suprafeţe mult mai mici, au o capacitate mai ridicată de nitrificare a substanţelor organice, randament superior la variaţiile de calitate a apei, costuri scăzute în exploatare şi pot funcţiona eficient în sezonul rece.

Filtrele biologice sunt folosite în cazul unor debite mici ale apelor uzate, şi sunt reprezentate de bazine umplute cu un strat de 2-4 m, format din piatră spartă, cărămizi sparte, zgură, cocs, materiale plastice etc, materialul filtrant fiind depus în bazine în funcţie de dimensiuni (cele mai mari la fund). Un drenaj format din plăci poroase asigură colectarea apelor filtrate şi dirijarea lor spre un colector secundar. Pe materialul filtrant se formează o peliculă biologică constituită din microorganisme, alge albastre, flagelate, ciliate etc, care asigură mineralizarea substanţelor organice (în special a celor hidrocarbonate) din apele uzate. Amorsarea filtrelor biologice durează minimum 3 săptămâni, perioadă în care debitul apei uzate este mult mai scăzut decât cel prevăzut prin proiect. Debitul este de altfel stabilit funcţie de rezultatele analizelor fizico-chimice ale probelor de apă recoltate la intrarea şi ieşirea din filtrul biologic.

În cazul epurării biologice artificiale cele mai folosite sunt însă bazinele de aerare cu nămol activ. Nămolul activ este constituit dintr-o masă gelatinoasă formată din bacterii şi protozoare, care asigură într-un prim stadiu degradarea materiilor organice hidrocarbonate, iar în stadiul următor a substanţelor organice cu azot. Aerarea apei uzate în bazinele

Scanned with OKEN Scanner

cu nămol activ se realizează fie prin metode mecanice, fie prin metode pneumatice şi are drept scop transferul de oxigen, recircularea flocoanelor cu nămol activ, împiedicarea sedimentării flocoanelor. Şi în acest caz amorsarea procesului durează 1 – 4 săptămâni, funcţie de parametrii fizico-chimici ai apei uzate, capacitatea bazinului de aerare, cantitatea de oxigen din apă etc, până concentraţia nămolului activ atinge cca 800-1000 mg/l. Apa rezultată după degradarea substanţelor organice de către organismele din nămolul biologic se scurge în decantoarele secundare (fiind supusă epurării terţiare), iar nămolul este înlăturat, (NEGULESCU şi SECARĂ, 1976). Epurarea terţiară urmăreşte neutralizarea şi eliminarea prin metode chimice a substanţelor minerale şi a celor organice care au rămas în apă după epurarea primară şi secundară. În cazul apelor menajere, treapta terţiară asigură defosfatarea şi denitrificarea acestora.

După epurarea apelor menajere şi uzate industrial rămâne de rezolvat problema nămolurilor rezultate, care trebuie tratate şi eliminate. Aceste nămoluri pot fi, în funcţie de proveniența lor, primare, secundare, chimice, iar după gradul de tratare pot fi – brute, fermentate, deshidratate, uscate. Prin fermentarea nămolului se urmăreşte distrugerea agenţilor patogeni din compoziţia lui, degradarea substanţelor organice puternic putrescibile, reducerea volumului acestuia prin îndepărtarea unei părţi din apa ce o conţine etc. Procedeele mai frecvent folosite pentru tratarea şi eliminarea nămolurilor rezultate din staţiile de epurare sunt prezentate în figura 7.2.

Aceste nămoluri pot fi folosite în agricultură, pot fi compostate, incinerate sau depuse în gropile de gunoi. Se apreciază că toate tipurile de nămol pot fi împrăştiate pe terenurile agricole dacă respectă legislaţia privitoare la impactul asupra mediului (nu conţin metale grele, agenţi patogeni etc). Folosirea în agricultură pare a fi cea mai ieftină cale de eliminare a nămolurilor rezultate în staţiile de epurare. Totuşi cantitatea de nămol care poate fi împrăştiată pe terenurile agricole nu este nelimitată, depinzând de necesarul de nutrienţi pentru plante. Se ridică de asemenea probleme cum ar fi: stocarea lui de către fermier, cheltuielile pentru transportul şi împrăştierea lui pe suprafeţele agricole, pentru analiza calităţii solului tratat cu acest nămol etc.

O altă metodă de tratare a nămolului biologic este compostarea lui, acţiune care urmăreşte stabilizarea acestuia prin degradarea aerobă a

Scanned with OKEN Scanner

substanţelor organice din compoziţia lui şi reducerea conţinutului în apă. Compostul rezultat este considerat un ingredient valoros de ameliorare a solului. Compostarea este însă un procedeu mult mai costisitor decât aplicarea în agricultură a nămolului brut.

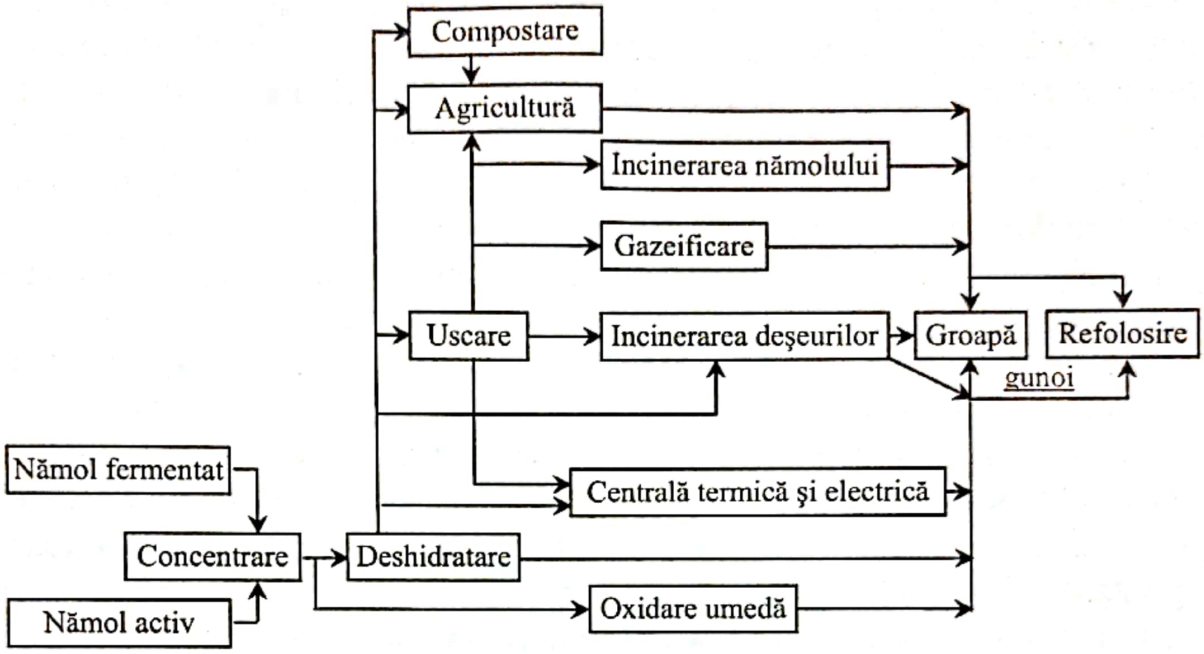


Fig. 7.2. Căi de tratare şi eliminare a nămolului, (INFOTERRA, 1999)

Uscarea nămolului este o modalitate de tratare, care asigură reducerea evidentă a volumului acestuia şi obţinerea unui produs igienic stocabil, care poate fi folosit ca îngrăşământ în agricultură şi silvicultură, drept combustibil în cuptoarele de ciment şi termocentrale, ca strat vegetal şi material de umplutură. Dezavantajul major al acestei metode de tratare este costul ridicat al investiţiei pentru instalaţiile de uscare.

În ultimul timp câştigă tot mai mult teren eliminarea nămolului din staţiile de epurare a apelor uzate prin incinerare. Deşi metoda presupune cheltuieli mari de investiţii, ea este tot mai agreată în ţările dezvoltate, deoarece reduce la minimum volumul de nămol după incinerare, asigură o valorificare energetică a nămolului, ca şi reciclarea unor subproduse rezultate (cenuşe, materiale inerte etc), reduce la minimum mirosurile emanate pentru că se realizează în sisteme închise şi la temperaturi ridicate.

Scanned with OKEN Scanner

În sfârşit, o altă modalitate de eliminare a nămolului o reprezintă depozitarea lui în gropile de gunoi, singur sau în amestec cu deşeurile solide orăşeneşti. Se apreciază că această metodă va fi tot mai restrâns folosită. Amplasamentele gropilor de gunoi trebuie să fie "uscate", adică să fie situate deasupra nivelului apelor subterane. Rezultate mai bune se obţin dacă nămolul brut este supus înaintea depozitării, deshidratării mecanice. Sunt rezerve în privinţa utilizării acestei metode din cauza potenţialului infecţios a unor microorganisme patogene prezente în el şi datorită mirosurilor dezagreabile emanate prin biodegradarea substanţelor organice din compoziţia lui. O dezinfecţie relativ bună se asigură prin adăugarea de var în nămol. În jurul gropii se realizează un sistem de puţuri de monitorizare a poluanţilor care eventual se scurg din ea.

7.2. Rezolvarea contradicţiei: protecţia plantelor – protecţia mediului

Este un lucru binecunoscut că, spre deosebire de plantele spontane, cele cultivate sunt – datorită monoculturii, mai expuse la atacul bolilor şi dăunătorilor. În plus ele sunt concurate şi de buruienile care apar în culturile agricole. Bolile, dăunătorii şi buruienile produc pagube importante plantelor agricole, implicit producţiei furnizate de ele şi de aceea, pentru combaterea lor s-au dezvoltat tehnologii de protecţie bazate în perioada modernă pe metode, în special chimice. Folosirea tot mai largă a pesticidelor în agricultură a intrat însă în conflict cu nevoia imperioasă de păstrare a sănătăţii mediului. Aşa se face că în ultimul timp se vorbeşte tot mai mult de o agricultură ecologică şi de produse agricole ecologice. În cele ce urmează vom prezenta unele informaţii privind posibilităţile actuale şi perspectivele de rezolvare a acestui conflict.

7.2.1. Strategii pentru controlul bolilor la plante

Patogenii plantelor sunt microorganisme (virusuri, bacterii şi fungi) care produc leziuni ţesuturilor, cu repercusiuni asupra creşterii diverselor organe, pot înfunda ţesuturile vasculare şi induce ofilirea plantelor, pot determina epuizarea lor metabolică etc, toate aceste tulburări soldându-se uneori cu pierderi importante de recoltă şi cu prejudicii aduse calităţii acesteia. Unii dintre aceşti patogeni au gazde

Scanned with OKEN Scanner

numeroase, alţii au specificitate înaltă nu numai de specie, ci chiar de organ. Specialiştii şi fermierii fac eforturi deosebite pentru selecţia unor varietăţi de plante de cultură rezistente la diverse boli. Din păcate, deşi monocultura pe suprafeţe mari are avantajele ei, ea favorizează răspândirea patogenilor. Totodată, tendinţa de a folosi în cultură un număr din ce în ce mai mic de genotipuri de plante este o practică periculoasă, pentru că poate asigura răspândirea unor patogeni co-adaptaţi, fenomen ce poate fi evitat în cazul promovării diversităţii genetice. Acest adevăr a fost de altfel demonstrat în China nu demult, unde prin cultivarea de către mii de fermieri din provincia Yunnan a unui amestec de varietăţi de orez (cu rezistenţă diferită la rugină) pe terenurile lor, s-a constatat o reducere dramatică a nivelului de infectare a plantelor, evitându-se astfel folosirea fungicidelor, (BENT, 2002).

Virusurile şi viroizii care atacă plantele deturnează funcţiile celulelor gazdă spre nevoile proprii, determinând astfel debilitarea acestora şi implicit diminuarea recoltei. Unele dintre aceste virusuri au efect devastator asupra unor organisme vegetale. Un exemplu îl reprezintă *virusul tristeza* care trăieşte în xilemul tulpinilor la citrice şi care, la sfârşitul anilor 1950 şi începutul anilor 1960, a provocat pagube enorme plantaţiilor cu citrice în California. În cazul bolilor produse de virusuri şi viroizi, nu putem discuta de strategii chimice de combatere, pentru că sunt ineficiente. Până nu demult combaterea unor astfel de fenomene se realiza doar mecanic (identificarea, eliminarea şi arderea plantelor infectate). În ultimele decenii s-a dovedit că astfel de situaţii pot fi prevenite, în special în horticultură, prin regenerarea plantelor din meristeme (libere de virusuri), aşa cum s-a discutat deja într-un capitol anterior. O altă soluţie şi mai recentă, despre care de asemenea am discutat, este transferul în genomul plantelor a genelor ce codifică proteinele de înveliş ale virusurilor. Un exemplu de reuşită de acest gen este salvarea culturilor de papaia ameninţate cu extincţia în Hawaii de către virusul petelor inelare prin transferul genei care controlează sinteza proteinei de înveliş a virusului (anterior boala era controlată prin combaterea cu pesticide a insectelor ce transmiteau virusul).

Bacteriile produc de asemenea pagube culturilor agricole, apreciate la 10-15% din cele provocate de boli. Ele pătrund în plante prin deschiderile naturale, prin răni sau cu ajutorul unor enzime specifice care dizolvă barierele de protecţie ale plantelor. Bacteriile produc leziuni la

Scanned with OKEN Scanner

nivelul frunzelor - reducându-le capacitatea de fotosinteză, şi fructelor - cărora le diminuează valoarea comercială. Foarte păgubitoare sunt bacteriile care invadează ţesuturile vasculare şi care produc ofilirea plantelor (prin blocarea vaselor). Un exemplu edificator este cel al bacteriei *Ralstonia solanacearum*, care provoacă ofilirea plantelor din nu mai puţin de 44 de genuri. Un impact negativ mai ridicat decât bacteriile asupra sănătăţii plantelor îl au fungii. Se apreciază că numărul de specii fitopatogene de fungi depăşeşte cifra 8000. Ele produc nu numai pierderi de recoltă la plantele cultivate (şi nu numai), ci şi substanţe toxice sau cancerigene pentru animale şi om. Ca şi bacteriile, fungii pătrund în plante prin deschiderile naturale, prin răni, prin mijlocirea unor enzime specifice. După ce pătrund în plante, unele fungi produc toxine - care alterează permeabilitatea membranelor, altele produc hormoni – care perturbă reglarea proceselor de creştere şi dezvoltare, distrug sistemul radicular al plantelor sau produc ofilirea plantelor etc. Dintre fungi, bazidiomicetele provoacă boli dintre cele mai distrugătoare, ele fiind cele care în anumite perioade au produs foamete şi depresiuni economice, (ele ar determina reducerea recoltei mondiale de boabe cu cca 10% anual). Pentru combaterea bolilor fungice şi bacteriene se folosesc de peste 120 de ani strategii chimice (când s-a inventat zeama bordoleză). Compuşii antibacterieni conţin cupru, sulf, antibiotice. În cazul fungilor se produc mereu compuşi de sinteză, care trebuie să fie tot mai eficienţi, dar să manifeste toxicitate slabă pentru om şi animale şi remanenţă scăzută. Se dezvoltă totodată mijloace de combatere biologică a unor boli. În cazul fungilor de exemplu, se acordă o atenţie deosebită biofungicidelor prin specularea fenomenului de micoparazitism. Este cazul speciilor de *Trichoderma*, capabile să perforeze peretele celular al unor fungi patogeni, să lizeze protoplasma acestora, să sporuleze şi să golească hifa parazitată. Au fost larg studiate *chitinaza* şi *celulazele* de *Trichoderma*. Se folosesc biopreparate cu *Trichoderma* pentru controlul unor boli produse de *Chondrostereum purpureum* la pomii fructiferi. S-au dezvoltat proiecte pentru tratarea căpşunilor împotriva speciei patogene *Botritis cinerea*, pentru tratamentul cartofilor împotriva unor specii de *Rhizoctonia*, sau a speciei *Heterobasidion annosum* care atacă specii silvice etc, (RICARD, 2002). Biopreparatele cu *Trichoderma* sunt inofensive pentru om şi anuimale. În combaterea bolilor produse de bacterii şi fungi plantelor apar probleme dificil de rezolvat: apariţia

Scanned with OKEN Scanner

relativ rapidă de forme rezistente la tratamente, cheltuielile importante necesare pentru producerea lor, toxicitatea tratamentelor cu fungicide şi substanţe bactericide asupra sănătăţii mediului şi omului etc.

Pentru protecţia împotriva bolilor şi insectelor, plantele şi-au dezvoltat pe parcursul milioanelor de ani mijloace fizice (pereţi celulari groşi, cuticulă cerată etc) şi chimici (fenoli, taninuri, glicozide, flavonoide, unele enzime etc). Substanţele produse de plante în urma infecţiilor poartă numele de *fitoalexine*. Genele activate după infecţie sunt denumite gene de protecţie, sau gene legate de patogeneză. Ele controlează sinteza unor proteine antimicrobiene (*chitinaze*, *glucanaze*), peptide antimicrobiene, alţi compuşi antimicrobieni etc. Plantele conţin gene de rezistenţă la patogeni, care controlează sinteza unor proteine de recunoaştere a unor compuşi produşi de patogen, cum ar fi proteina de înveliş a unor virusuri, sau factori de virulenţă bacterieni, sau unele proteine fungice de suprafaţă etc. S-a constatat că genele de rezistenţă ale diverselor specii de plante codifică proteine cu structură foarte apropiată, ceea ce înseamnă că ele sunt înalt conservate. Se apreciază că fiecare specie de plantă poartă în genom câteva sute de gene de rezistenţă, (BENT, 2002).

Dacă unele genotipuri de elită cultivate sunt deficiente în anumite gene de rezistenţă, atunci acestea pot fi "împrumutate" (prin retroîncrucişări) de la rude sălbatice. Promiţătoare sunt tehnicile ingineriei genetice. Una dintre ele ar fi transferul genei pentru un compus antimicrobian, cum ar fi bunăoară gena ce codifică chitinaza, pentru dobândirea rezistenţei la fungi. Reuşita pare să fie doar parţială, fiind necesară prezenţa mai multor compuşi antimicrobieni pentru asigurarea succesului. Aşa cum arătam într-un capitol anterior, perspective deosebite în combaterea unor boli virotice la plante le conferă transferul genelor pentru proteinele de înveliş ale virusurilor, acţiune care stopează multiplicarea virusului, mecanismul prin care se produce acest lucru fiind încă puţin înţeles. Un succes de acest gen a fost obţinut în combaterea virusului petelor inelare care punea în pericol culturile cu papaia din Hawaii, OMG care în prezent se comercializează. O altă strategie de evitare a pesticidelor o constituie creşterea nivelului de exprimare a proteinei NPR-1, care activează genele de rezistenţă din plante şi implicit un răspuns mai eficient la atacul patogenilor. Un mediator chimic cu această calitate este acidul salicilic. Cum stropirea plantelor cu

Scanned with OKEN Scanner

acid salicilic ar putea deveni toxică, specialiştii au identificat compuşi cu structură asemănătoare acestuia, mai puţin toxici şi care acţionează un timp mai îndelungat, (BENT, 2002).

7.2.2. Strategii pentru combaterea buruienilor

Buruienile, care ar putea fi definite ca plante ce cresc unde nu sunt dorite de om, sunt în competiţie cu plantele de cultură pentru lumină, apă şi nutrienţi, de aceea prezenţa lor în cultură determină pierderi importante de recoltă. Din cele peste 250 de mii de plante superioare, doar câteva sute sunt buruieni care provoacă pagube culturilor agricole, buruienile având două însuşiri comune: *competitivitatea* (capacitatea de a folosi resursele mediului în detrimentul plantelor de cultură) şi *persistenţa* (capacitatea de a supravieţui de la an la an). Alte caracteristici ale buruienilor, care le fac de temut în culturile agricole sunt: producţia înaltă de seminţe, fecunditata ridicată, adaptări la coexistenţă şi răspândire cu seminţele plantelor cultivate, producerea de alelo-substanţe care inhibă creşterea altor plante, ratele înalte ale fotosintezei, sistemul radicular extins, capacitatea organelor de propagare de a supravieţui la condiţii vitrege de viaţă etc. Interesant este faptul că cca 2/3 din buruienile cele mai dăunătoare fac parte din 12 familii de plante superioare din cele cca 450 de familii stabilite de taxonomişti, (tabelul 7.1).

Tabelul 7.1. Exemple de buruieni în cadrul celor 12 familii de plante care cuprind majoritatea buruienilor păgubitoare, (după TRANEL, 2003)

Nr. crt	Familia de plante	Exemple de buruieni	Exemple de culturi agricole
1	Poaceae	*Cynodon dactylon* *Echinochloa crus-galli* *Sorghum halepense*	Grâu
2	Cyperaceae	*Cyperus rotundus,* *C.esculentus, C. difformis*	Nici o cultură majoră
3	Asteraceae	*Cirsium arvense* *Xanthium strumarium* *Taraxacum officinale*	Floarea soarelui
4	Polygonaceae	*Polygonum convolvulus* *Rumex crispus, R. acetosella*	Hrişcă
5	Amaranthaceae	*Amaranthus hybridus, A. spinosus, A. retroflexus*	Amaranthus

Scanned with OKEN Scanner

6	Brassicaceae	*Capsella bursa-pastoris* *Cardaria draba* *Brassica kaber*	Rapița (canola)
7	Fabaceae	*Medicago lupulina* *Mimosa pudica* *Pueraria lobata*	Soia
8	Convolvulaceae	*Convolvulus arvensis* *Cuscuta campestris* *Ipomoea aquatica*	Cartof dulce
9	Euphorbiaceae	*Euphorbia esula, E. hirta, E. maculata*	Manioc
10	Chenopodiaceae	*Chenopodium album, C. murale, Salsola iberica*	Sfeclă de zahăr
11	Malvaceae	*Hibiscus trionum* *Abutilon theophrasti* *Sida rhombifolia*	Bumbac
12	Solanaceae	*Solanum nigrum* *Datura stramonium* *Physalis angulata*	Cartof

La majoritatea buruienilor, competiția este cel mai important tip de competiție plantă-plantă. La aceasta se adaugă *alelopatia*, adică producerea unei substanțe (alelochimice) care împiedică creşterea altei plante, (TRANEL, 2003).

În managementul buruienilor s-au dezvoltat 3 abordări: prevenirea, controlul şi eradicarea lor. Controlul buruienilor se realizează prin mijloace culturale, mecanice, biologice şi chimice. Dintre acestea, erbicidele au câştigat tot mai mult teren în lupta cu buruienile în ultimii 50 de ani şi vor continua să ocupe un loc important şi în perioada ce urmează, chiar dacă impactul lor negativ asupra mediului şi sănătății omului şi animalelor este unul cert (chiar dacă sunt mai puțin toxice ca insecticidele), iar cheltuielile anuale cu producerea lor sunt apreciate la cca 15 miliarde de dolari. Unele erbicide sunt distribuite în întreaga plantă (*erbicide sistemice*), altele nu sunt translocate în toată planta (*erbicide de contact*), eficiența celor din urmă depinzând de gradul de acoperire a țesutului foliar. Cele mai multe erbicide blochează activitatea unei enzime specifice, (TRANEL, 2003).

Şi în managementul buruienilor biotehnologia încearcă să găsească soluții, noi abordări. Una dintre ele o constituie izolarea de varietăți de cultură rezistente la erbicide (CRE), care în mod normal sunt

Scanned with OKEN Scanner

letale sau foarte nocive. Aceste forme rezistente se obțin fie prin selecția de variații apărute spontan, fie prin selecția în loturi de plante mutagenizate artificial, fie prin inserția de gene specifice. Despre unele reușite din categoria celor din urmă am amintit deja într-un capitol anterior. Astfel, geneticienii au obținut CR la *glifosat* (erbicid care controlează cele mai multe specii de buruieni majore), prin inserția în plantele de cultură a unei gene modificate de *Agrobacterium.* Gena determină rezistență locului de țintire a erbicidului și anume 5-enolpiruvil-șikimat-3-fosfat-sintaza (EPSP-sintaza), culturile rezultate fiind denumite *Roundup Ready* (manifestă rezistență la erbicidul *Roundup*, care conține ca substanță activă glifosatul). În SUA, peste 50% din piața de soia este ocupată de varietăți de cultură Roundup Ready. S-au obținut de asemenea culturi denumite *Liberty Link*, care manifestă rezistență la erbicidul *fosfinotricin* (o versiune de sinteză a unei toxine produsă de *Streptomyces hygroscopicus*), prin transferul la plantele de cultură a genei care codifică enzima fosfinotricin – N-acetil transferaza (care transformă fosfinotricinul într-un produs netoxic). Multe dintre CRE s-au obținut prin selecție și nu atât prin inginerie genetică, și de aceea nu pun problema respingerii lor de către opinia publică, așa cum e cazul OMG. Se studiază de asemenea posibilitatea modificării proprietăților alelopatice ale culturilor, adică să se izoleze plante de cultură care produc propriul lor erbicid (plante care să semene cu *S. hygroscopicus*, care să producă atât toxina, cât și enzima care degradează această toxină), (TRANEL, 2003).

7.2.3. Strategii pentru combaterea dăunătorilor

Se apreciază că dăunătorii produc pierderi medii anuale în producția vegetală mondială de peste 20%, cele mai păgubitoare fiind insectele. De reținut că dăunătorii produc pagube nu numai în culturile agricole, ci și produselor agricole conservate (semințe, tuberculi, rădăcini etc). În acțiunea de combatere a dăunătorilor cel mai adesea se folosesc metodele chimice. Pentru evitarea poluării solului și produselor vegetale cu pesticide, în ultimele decenii s-au pus la punct și metode de control biologic al dăunătorilor, cu ajutorul prădătorilor, paraziților și bolilor care-i distrug. S-a constatat că deși din anii 1950 se folosesc insecticidele, pierderile de recoltă provocate de insecte au rămas la un nivel de cca 12% până la începutul anilor 1990 (tabelul 7.2), unele

Scanned with OKEN Scanner

pierderi fiind mai mari în 1990 decât în 1965. În sfârşit o altă strategie folosită în lupta cu dăunătorii este cultivarea de plante rezistente la aceştia. În ciuda efectului lor negativ asupra mediului, pesticidele au fost şi vor continua să fie utilizate în agricultură, întrucât pierderile de recoltă sunt estimate la 35 - 100% dacă nu se apelează la pesticide, în timp ce prin folosirea lor, aceste pierderi se situează între 0 – 20%. Trebuie precizat că însăşi natura chimică a pesticidelor s-a schimbat în timp: de la *DDT* în anii 1940, s-au produs insecticide mai sigure pe bază de *organofosfaţi* şi *carbamaţi* în anii 1950-1960, pentru ca după anii 1970 şi acestea să fie înlocuite cu pesticide pe bază de *piretroizi* (mult mai inofensive pentru sănătatea omului, animalelor şi mediului).

Tabelul 7.2. Pierderile de recoltă în agricultura mondială provocate de insecte şi viermi, (după BENEDICT, 2003)

Cultura	% pierderi de recoltă		
	1965	1988-1990	Schimbări produse
Orz	3,9	8,8	+4,9
Porumb	13,0	14,5	+1,5
Bumbac	16,0	15,4	-0,6
Cartof	5,9	16,1	+10,2
Orez	27,5	20,7	-6,8
Soia	4,4	10,4	+6,0
Grâu	5,1	9,3	+4,2
Media	10,8	13,6	+2,8

Dintre activităţile din agricultură care favorizează proliferarea (explozia) dăunătorilor, menţionăm:

- monocultura, care asigură hrana favorită pe suprafeţe mari unor dăunători;
- amplasarea unor culturi în zone lipsite de duşmani naturali pentru unii dăunători;
- introducerea inconştientă a unor specii dintr-o zonă geografică în alta;
- distrugerea accidentală a unor duşmani naturali ai dăunătorilor prin anumite practici agricole;
- adaptarea unor dăunători la un anumit pesticid datorită folosirii lui repetate etc.

Scanned with OKEN Scanner

Managementul integrat al dăunătorilor (MID) presupune folosirea de strategii multiple care să evite explozia acestora, sintetizate astfel de BENEDICT, (2003):

- *Controlul biologic*: introducerea permanentă de dușmani naturali; eliberarea în masă și repetată de dușmani naturali; folosirea de nematode parazite și de biopesticide (boli bacteriene, fungice sau virale specifice dăunătorilor);
- *Controlul cultural*: momentul cultivării, irigării, recoltării; lucrările de întreținere utilizate; rotația culturilor și înlăturarea resturilor vegetale; practicarea culturilor intercalate (a două sau mai multe specii pe aceeași suprafață) și folosirea varietăților rezistente la dăunători;
- *Controlul mecanic și fizic*: utilizarea de paravane, capcane, bariere, surse de lumină, încălzire, răcire, alte tipuri de energie pentru atragerea, respingerea sau distrugerea dăunătorilor;
- *Controlul reproductiv și genetic*: utilizarea de substanțe care influențează reproducerea dăunătorilor; cultivarea și eliberarea în masă a indivizilor sterili; inserția în populația dăunătorului a unor gene nefavorabile;
- *Controlul chimic*: folosirea pesticidelor, feromonilor, hormonilor specifici dăunătorilor, care le perturbă creșterea, supraviețuirea sau reproducerea etc.

Strategiile de control ale dăunătorilor urmăresc nu atât combaterea exploziilor, cât mai ales prevenirea lor. În acest sens, importante sunt practicile agricole utilizate, rotația culturilor, cultivarea de varietăți de plante rezistente la dăunători etc. O soluție avantajoasă pentru MID o reprezintă practicarea ultimei metode deoarece, în acest fel, se asigură controlul dăunătorilor pe tot parcursul sezonului de vegetație, cheltuielile sunt mai mici decât prin administrarea pesticidelor, se evită orice efect negativ asupra mediului și sănătății omului, pe termen lung beneficiile sunt mai mari etc.

Pe parcursul milioanelor de ani plantele și-au elaborat mijloace chimice (metaboliți secundari) pentru a se proteja împotriva animalelor ierbivore sau a dăunătorilor. Mai mult, în timp ce spectrul toxinelor produse de om pentru combaterea unor dăunători este îngust (fapt ce le permite adaptarea relativ rapidă la acestea), unele plante spontane produc numeroase substanțe toxice, ceea ce face mai dificil acest proces de

Scanned with OKEN Scanner

adaptare. Se apreciază că o mai bună înțelegere a relației matabolîți secundari/dăunători ar putea aduce contribuții majore la controlul în culturile agricole a unor dăunători. Una din tehnicile folosite de amelioratori la obținerea de plante de cultură rezistente la boli și dăunători este "împrumutarea" (prin hibridare sau prin alte metode) acestui(or) caracter(e) de la rudele lor sălbatice. Exemplele sunt numeroase. Exemple celebre sunt varietățile de grâu rezistente la *musca de Hessa* (*Myetiola destructor*) obținute în urmă cu mai bine de 5 decenii (prin încrucișări cu specii sălbatice de grâu, pir sau *Aegilops*), sau combaterea *filoxerei* din podgoriile europene la sfârșitul secolului al XIX-lea (prin folosirea de portaltoi americani de viță sălbatică). Promovarea în cultură a unor varietăți rezistente la unii dăunători contribuie implicit la controlul unor boli răspândite de către aceștia. Desigur că e dificil de controlat toți dăunătorii prin extinderea în cultură a unor forme rezistente la un dăunător sau altul. Potrivit unor estimări, în SUA cultivarea varietăților rezistente la dăunători pentru porumb, orz, sorg și lucernă reduce cu 30% administrarea de pesticide. De aceea, în viitorul previzibil nu se întrevede posibilitatea renunțării totale la metodele chimice de combatere, ci vom asista doar la limitarea lor.

Se pun speranțe în obținerea prin manipulare genetică a unor varietăți neconvenționale rezistente la dăunători, care să asigure un control al dăunătorilor de peste 80%, (BENEDICT, 2003). Primele gene folosite în acest scop au fost genele *Cry* (sau *Bt*) care controlează sinteza unor proteine de *Bacillus thuringiensis*, proteine care manifestă toxicitate diferită pentru unele insecte și nevertebrate (fluturi, gândaci, țânțari și nematode), iar primele varietăți transgenice pentru aceste proteine la bumbac, porumb și cartof au fost realizate la mijlocul anilor 1990. În 2001 erau cultivate varietăți Bt ale celor 3 specii pe aproape 5 milioane de hectare în mai multe țări de pe toate continentele și asigurau controlul unor insecte rezistente la insecticidele convenționale. Încă din anul 2000, cca 1/2 din bumbacul și 1/3 din porumbul cultivate în SUA erau reprezentate de plante modificate Bt. Folosirea bumbacului Bt în China a asigurat creșteri de recoltă de cca 25% față de culturile convenționale. De perspectivă apar și proteinele insecticid *Vip*, produse de *Bacillus cereus*, pentru rezistența porumbului la unii dăunători.

Scanned with OKEN Scanner

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

ACHAR P. N., *A study of factors affecting embryo yields from anther culture of cabbage*. Plant Cell, Tissue and organ Culture Kluwer Academic Publishers, 2002, 69, 183-188.

ACHUTEGUI-BETELU A. M., SCHMIDT J., *Radiation sensitivity of in vitro cultures of Ullucus tuberosus and Oxalis tuberosa*. Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. IAEA, Vienna, 1986,161-167.

ADAMUS A., SAMEK L., *Increasing the efficiency of white cabbage (Brassica oleracea L., var. capitata) androgenic embryos production*. [www. biotech. univ.gda. pl/imprezy/IAPTC/sessions/sess_6.html, 2003]

AHLOOWALIA B.S., *Plant regeneration from callus culture in wheat*. Crop Sci., 1982, 22, 405-410.

ALFERMAN A.W., *Primary and secondary metabolism*. Plant Cell Cult., Berlin Springs, 1985, 316.

AMMIRATO P.V., EVANS D.A., SHARP W.R., YAMADA Y., *Handbook of Plant Cell Culture*, 3. Crop Species., Mac Millan Publ. Co., New York-London, 1984.

AO G. M., ZHAO S. X., LI G. H., *In vitro induction of haploid plantles from unpollinated ovaries of corn (Zea mays L.)*. Acta. Genet. Sinic.,1982, 9, 281-283.

ARI S., *Effects of X and gamma rays on the regeneration capacity of calli derived from mature embryos in barley*. Proceed. VII-th Internat. Congress of IAPTC, Amsterdam, 1990, 24-29 June, 426.

ARMSTRONG K. C., NAKAMURA C., KELLER W.A., *Kariotype instability in tissue culture regenerants of Triticale (Triticosecale Wittmack) c.v. Welsh from 6-month-old callus cultures*. Z. Pflanzenzücht, 1983, 91, 233-245.

ASSELIN DE BEAUVILLE M., *Obtention d'haploides in vitro d'ovaries non feconds de Riz, Oryza sativa L.*, C. R. Acad. Sci. Paris, 1980, 10, 489-492.

ATANASIU L., *Utilizarea fotosintezei ca sursă alternativă de energie*. Biotehnologii moderne. Ed. "Tehnică", București, 1990, 257-273.

ATANASOV A., VLAKHOVA M., DENCHEV P., *In vitro embriogenesis and cell selection for alfalfa genetics and breeding*. Proceed. Symp. "Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. IAEA, Vienna, 1986, 35-40.

AUGEREAU J.M., COURTOIS D., PETIARD V., *Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil layer*. Plant Cell Repts, 1986, 5, 5, 372-376.

Scanned with OKEN Scanner

BADEA E., RAICU P., *Unele aspecte genetice privind multiplicarea in vitro la viţa de vie* . Analele Univ. Bucureşti, 1981, 30, 23-26.

BADEA E., RAICU P., *The effect of genotype and culture age on the morphogenetic potential of Datura innoxia Mill. callus culture and on the ploidy of regenerates*. Rev. Roum Biol., Ser. Biol. Végét., 1983, 28, 2, 153-156.

BADEA E., RAICU P., *In vitro anther and pollen culture in haploids (n=12) and triploids (3n=36) of Datura innoxia*. Rev. Roum Biol., Ser. Biol. Végét., 1982, 27, 2, 163-165.

BADEA E., RAICU P., *Experimental androgenesis in Datura innoxia with different level of ploidy (2n, 4n, 6n)*. Rev. Roum Biol., Ser. Biol. Végét., 1983, 28, nr.1, 59-61.

BADEA E., RAICU P., *Culturi de celule şi ţesuturi vegetale – aplicaţii în agricultură*. Ed."Ceres", Bucureşti, 1984, 254 p.

BADEA E., RAICU P., *Androgeneza şi ginogeneza experimentală în cultura de celule in vitro la plante*. Bitehnologii moderne. Ed. "Tehnică", Bucureşti, 1990, 112-129.

BADEA E., GORENFLOT R., RAICU P., *Androgenése, organogenése somatique chez Petunia hybrida et niveaux de ploidie*. Rev. Cytol. Biol. Végét. - Bot., 1994, 16, 135-146.

BADEA E., LUPUSANSKI I., RAICU P., *Evaluarea capacităţii androgenetice la linii izogene de Triticum aestivum L.* Lucr. Simp. Nat. de Culturi de Celule şi Ţesuturi Vegetale, Ed. Univ. Bucureşti, 1993, 5, 199-206.

BADEA E., SĂULESCU N. N., ITTU Gh., VERZEA M., COMAN I. *Androgeneza experimentală la hibrizii F_1 de Triticum aestivum L.*, Cercet. Genet. Veget. Anim., 1992, 2, 35-37.

BADEA M.E., SĂNDULESCU D., *Biotehnologii vegetale*. Fundaţia "BIOTECH", Bucureşti, 2001, 295.

BAJAJ Y.P.S., *In vitro preservation of genetic resources: Techniques and Problems*. Proced. Symp. "Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement", IAEA, Vienna, 1986, 43-57.

BAJAJ Y.P.S., *Regeneration of plants from frozen (-196^0 C) protoplasts of Atropa belladonna L., Datura innoxia Mill. and Nicotiana tabacum L.* Indian J. Exp. Biol., 1988, 26, 4, 289-292.

BAJAJ Y.P.S., SOPORY K., *Biotehnology of potato improvement*. Biotehnology in Agriculture and Forestry, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1986, 2.

BAROTTI S., *Genetic variability in plants regenerated from in vitro culture of sunflower (Helianthus annuus L.)*. Plant Breed, 1995, 114, 3, 275-280.

BĂRA I.I., CÎMPEANU M. M., *Genetica*., Edit. „Corson" Iaşi, 2003, 233p.

Scanned with OKEN Scanner

BĂRA I. I., GHIORGHIȚĂ I.G., *Din enigmele evoluției. Apomixia și rolul ei în evoluție*. Edit. „Șt. și Enciclop"., București, 1980, 213p.
BELLON G., PAVIRANI A., LAMY D., GILLY R., *Peut-on guerir la mucoviscidose?* La Recherche, 1994, 270, 1119-1121.
BERLIN J., *The use of immobilized plant cells-an evaluation*. Newsletter (I.A.P.T.C.), 1985, 46, 8-14.
BERLIN J., MOLLENSCHOTT C., DI COSMO F., *Comparison of various strategies designed to optimize indole alkaloid accumulation of a cell suspension culture of Catharanthus roseus*. Z. Naturforsch, 1987, C42, 9-10, 1101-1108.
BHOJWANI S.S., RAZDAN M.K., *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, 5. Developments in Crop Science, Elsevier Oxford, New York, Tokyo, 1983.
BOLDOR O., POPOVICI GH., *Producerea de proteine neconvenționale prin tehnologii de cultivare intensivă a microalgelor*. Biotehnologii moderne. Ed. "Tehnică", Buc., 1990, 222-238.
BOND O., *L'etrange reprogrammation du genome des clones*. La Recherche, 2002, 351, 16-17.
BRAR D.S., KHUSK G.S., *Wide hybridization and chromosome manipulation in cereals*. Handbook of Plant Cell Culture, 1986, 4, 221-263
BRAR D.S., UCHIMIYA H., *Genetic engineering of crop plants*. Plant tissue culture: applications and limitations (S. S. Bhojwani ed.), Elsevier Publ. Netherlands, 1990, 346-365.
BREZEANU A., *The effect of some biotic factors on Vitis vinifera L. mesophyle protoplasts isolation*. Nat. Symp. on Plant Cell and Tissue Culture, Cluj-Napoca, 4, 7-9 dec. 1989, 92-93.
BREZEANU A., PETCU I., RADU M., *Fusogenic potential of the protoplasts under low frequency alternative electric field, related to preparatory conditions*. Nat. Symp. on Plant Cell and Tissue Culture, Cluj-Napoca, 7-9 dec. 1989, 4, 221-263.
BREZEANU A., *Ultrastructural peculiarities of the plastidial system in Vitis vinifera L cells from callus culture*. Rev. Roum. Biol, Biol. veget., 1991, 36, 1-2, 45-48.
BROWN A.T., *Gene cloning - an introduction*. Chapman and Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, 1995, 334p.
BRUNNER H., NOVAK F.J., *Spontane, induzierte und somaklonale variation in klonen*. Plant Breeding, 1988, 100, 245-260.
CACHIȚĂ-COSMA D., *Metode in vitro la plantele de cultură*. Ed. "Ceres", București, 1987, 274 p.
CACHIȚĂ-COSMA D., CRĂCIUN C., *Ultrastructural studies on some ornamentals*, Handbook of Plant Cell Culture, Ed. Evans D.A. et al., V,

Scanned with OKEN Scanner

Ed. Mc Graw. Hill, Publ. Co. SUA, 1990, 57-94.
CACHIŢĂ-COSMA. D., *The effect of nature and origin of explants on micropropagation*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. High – Tech and Micropropagation, Ed. Bajaj Y.P.S., vol. 17/1, Ed. Springer-Verlag Berlin, 1991,142-167.
CACHIŢĂ-COSMA D., HALMÁGYI A., CRISTEA V., *Conservarea germoplasmei vegetale in vitro*. Culturi *in vitro* la cormofite, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 1999, 54-61.
CACHIŢĂ-COSMA D., DELIU C., RAKOSY-TICAN L., ARDELEAN A., *Tratat de biotehnologie vegetală*, Ed. „Dacia", Cluj-Napoca, 2004, 1, 433p
CASSELS B.K., BREITMAIER E., ZENK M.H., *Bisbenzylisoquinoline alkaloids in Berberis cell cultures*. Phytochemistry, 1987, 26, 4, 1005-1008.
CAVALLINI A., LUPI M.C., *Cytological study of sunflower (Helianthus annuus L.)*. Plant Breed., 1987, 99, 203-208.
CEGIELSKA T., SZALA L., KROTKA K., *Influence of temperature and giberelic acid on conversion of microspore derived embryos of winter oilseed rape (Brassica napus L.)*. [www. Biotech.univ.gda.pl/imprezy/ IAPTC/ sessions /sess_6.html], 2003.
CĂŢINAŞ L., *Inducţia de calus şi regenerarea de plante din culturi de embrioni imaturi la triticale*. Culturi *in vitro* la cormofite, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca,1999, 218-223.
CHIRU N., CACHIŢĂ C.D., *Obţinerea de variaţii somaclonale prin culturi de calus, la cartof (Solanum tuberosum L.)*. Lucrările Simp. Nat. de Culturi de Celule şi Ţesuturi Vegetale, Arad, 10-12 iulie 1997, 7, 64-74.
CHLYAH H., CHERKOUI S., SAIDI N., *Green haploid production in durum wheat by various haplomethods*. Plant Biotechnology for sustainable development of agriculture, 28 July - 1 August, 1996, Beijing, China,1999, 119-123.
CHOU J. U., *Pollen dimorphism and its relation in the formation of pollen embryos in anther culture of wheat (Triticum aestivum L.)*. Acta Bot. Sin.,1980, 22, 117-121.
CHRISPEELS J.M., SADOVA E.D., *Plants, genes and crop biotechnology*. Jones and Bartlett Publ., 2003, 562 p.
CHU C. C., *The N_6 medium and its applications to anther culture of cereal crops*. Proceed. Symp. Plant. Tissue Cult. Science Press. Peking,1978, 45-56.
CHU C. C., *Progresses in anther and microspore culture of crops*. Plant biotechnology for sustainable development of agriculture, 28 July - 1 August, 1996, Beijing, China, 1996, 66-72.
CHUNG C.T.A., STABA E.J., *Effects of age and growth regulators on*

Scanned with OKEN Scanner

Omul a încercat dintotdeauna, cu mai mult sau mai puțin succes, să se inspire și să învețe de la natură. Pe măsură ce s-a pătruns tot mai adânc în tainele viului, s-au dezvoltat și înmulțit și tehnologiile care au pus în valoare cunoștințele acumulate.

Primele biotehnologii au o vechime memorabilă, omul folosind empiric încă de acum câteva mii de ani unele procese de fermentație pentru prepararea berii, vinului, oțetului sau pâinii . Ilustrul savant francez Louis Pasteur, prin descoperirile sale din secolul al XIX-lea în domeniul microbiologiei, punea bazele biotehnologiilor argumentate științific. S-a produs apoi o veritabilă „explozie" a utilizării microorganismelor în obținerea celor mai diverse bunuri și servicii necesare omului. Un alt moment crucial în dezvoltarea biotehnologiilor a fost reprezentat de descoperirile din domeniul geneticii, care au urmat descifrării în 1953 a structurii ADN-ului și care au permis trecerea după 1970 la manipulările genetice pe organismele vii.

Operațiunile de transgeneză, clonarea la plante și animale, secvențierea genomului unor organisme etc, se vor traduce cu siguranță în modalități noi și tot mai diverse de slujire a interesului omului. Provocările imediate ale bioingineriei și biotehnologiei par a fi transferul genelor fixatoare de azot la unele plante cultivate, pătrunderea mecanismelor intime ale imunității, a procesului de îmbătrânire la om și a soluțiilor de întârziere a acestuia, izolarea genelor „bolnave" la om și terapia genică a lor, tratamentul unor maladii umane grave cum sunt cancerul, SIDA, bolile neurodegenerative etc.

Prezenta lucrare reprezintă o încercare de ilustrare succintă a unora din problemele și contribuțiile biotehnologiilor mai vechi și mai noi, din care cititorul își poate face o imagine asupra impactului în viața noastră de zi cu zi a acestui fascinant domeniu de activitate umană.

Autorii

ISBN 973-37-1099-7

Scanned with OKEN Scanner